

31

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE VETERINARIA  
DEPARTAMENTO DE BIOQUÍMICA Y BIOLOGÍA MOLECULAR IV

METABOLISMO GLICIDICO EN MÚSCULO DE LUBINA  
(*DICENTRARCHUS LABRAX* L.). REGULACIÓN A NIVEL DE LAS  
ENZIMAS PIRUVATOQUINASA Y FOSFOFRUCTOQUINASA.

M. CARMEN SERRADILLA CASTAÑO.

MEMORIA PRESENTADA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN VETERINARIA..

Directores de la Tesis:

Dra. M. Jose Herranz Santos.

Dra. M. Luz Perez Perez.

Madrid, 1992.

*A Nacho, lo más importante de mi vida.*

Este trabajo de investigación ha sido realizado en el Departamento de Bioquímica y Biología Molecular IV de la Facultad de Veterinaria, bajo la dirección de las Dras. M<sup>a</sup> Jose Herranz Santos y M<sup>a</sup> Luz Pérez Pérez.

Deseo expresar mi más sincero agradecimiento a todas aquellas personas que de una forma u otra han contribuido a que este trabajo llegue a su fin, en especial:

A M<sup>a</sup> Jose Herranz y M<sup>a</sup> Luz Pérez, por su ayuda humana y material a lo largo de todos estos años y por la confianza que desde un principio depositaron en mí.

A Alicia Gibello, por su aliento y apoyo y porque su constancia en el trabajo y su amistad han sido para mí un estímulo constante.

A Mónica Suarez, Elvira Cuenllas y Soledad Gaitán porque no solo hemos compartido el trabajo sino una gran amistad.

A Amando Garrido por su amable acogida y por la ayuda que siempre me ha prestado.

A Jose Manuel Bautista, por las fotos, las ideas y sobre todo por su entusiasmo por la Bioquímica.

A Amalia Díez, M. Isabel Prieto y Rafael Zardoya, porque trabajar con ellos en estos últimos años ha enriquecido algo más que mi trabajo.

A M. Dolores Fideu y Javier Fernandez por su ayuda en los primeros tiempos.

A todos mis compañeros, en especial a Margarita Martín, Estrella Ferrer y Milagrosa Gallego por el cariño que siempre me han demostrado y por todo lo que he aprendido de ellos que tanto ha contribuido a mi formación humana y personal.

A las salinas "Esperanza Siglo XIX" y "Cultivos piscícolas marinos S.A." de San Fernando (Cádiz) por la donación desinteresada del material biológico.

Al Dr. Abelardo Gómez Parras y a todo el personal del Instituto de Ciencias Marinas de Andalucía por las facilidades prestadas para la utilización de sus instalaciones en el procesado de las muestras.

Al Dr. J.J. Aragón y a su equipo por la ayuda prestada en la determinación de la F-2,6-P<sub>2</sub>.

A la Dra. P. Hitos por la determinación de la concentración de aminoácidos.

A Ana Serradilla, por su revisión cuidadosa de todo lo que escribo.

A mis padres, porque sin ellos y sin la formación que me han dado nunca hubiera llegado a terminar este trabajo y sobre todo por la comprensión que han demostrado con algo que nunca acabaron de entender.

INDICE.

<b>CAPÍTULO I. - INTRODUCCIÓN.</b>	1
I.1. Aspectos generales de la lubina.	3
I.2. Organización muscular en los peces.	8
I.3. Metabolismo de carbohidratos en peces.	13
I.4. Piruvatoquinasa.	24
I.5. Fosfofructoquinasa.	30
I.6. Objeto del trabajo.	38
<b>CAPÍTULO II. - MATERIAL Y MÉTODOS.</b>	39
II.1. Material.	39
II.1.1. Material biológico.	39
II.1.2. Productos utilizados.	39
II.1.3. Aparatos utilizados.	40
II.2. Métodos.	42
II.2.1. Determinación de metabolitos.	42
II.2.1.A. Preparación de muestras y obtención de extracto.	42
II.2.1.B. Determinación de la concentración.	42
II.2.1.C. Cálculo de las concentraciones de metabolitos.	44
II.2.2. Preparación de extractos enzimáticos.	45
II.2.3. Determinación de las actividades enzimáticas.	46
II.2.4. Determinación de la concentración de proteínas.	48
II.2.5. Determinación de las propiedades físico-químicas.	49
II.2.5.A. Estabilidad enzimática.	49
II.2.5.B. Influencia del pH.	49
II.2.5.C. Influencia de la temperatura.	50
II.2.6. Cálculo de los parámetros cinéticos.	51
II.2.7. Proceso de purificación enzimática.	52
II.2.8. Electroforesis en geles de poliacrilamida.	55
II.2.8.A. Condiciones no desnaturalizantes.	55
II.2.8.B. Condiciones desnaturalizantes.	55
II.2.8.C. Tinción de los geles.	56
II.2.9. Determinación del peso molecular.	56
II.2.9.A. Mediante electroforesis en gel.	56
II.2.9.A. Mediante cromatografía de filtración en gel.	57
II.2.10. Valoración de datos.	57
<b>CAPÍTULO III. - RESULTADOS: DETERMINACIÓN DE METABOLITOS.</b>	59
III.1. Determinación de la concentración intracelular de metabolitos.	59
<b>CAPÍTULO IV. - RESULTADOS: PIRUVATOQUINASA.</b>	61
IV.1. Estudios preliminares de la enzima.	61
IV.1.1. Exploración de la piruvatoquinasa en diversos órganos de lubina.	61
IV.1.2. Propiedades físico-químicas de la enzima.	61
IV.1.2.A. Estabilidad enzimática.	61
IV.1.2.B. Influencia del pH.	62
IV.1.2.C. Influencia de la temperatura.	63
IV.1.3. Propiedades cinéticas de la piruvatoquinasa.	65
IV.1.3.A. Influencia de los sustratos.	65

IV.1.3.B. Modulación de la piruvatoquinasa.....	66
IV.1.3.B.a. Influencia del pH.....	66
IV.1.3.B.b. Influencia de la temperatura.....	66
IV.1.3.B.c. Influencia de diferentes efectores.....	67
IV.2. Purificación e investigación de formas enzimáticas.....	69
IV.2.1. Tratamiento térmico.....	69
IV.2.2. Cromatografía de filtración en gel.....	69
IV.2.3. Cromatografía de afinidad.....	70
IV.2.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	72
IV.2.5. Determinación del peso molecular.....	73
IV.3. Estudio del comportamiento cinético de la enzima.....	74
IV.3.1. Influencia de la concentración de sustrato sobre la actividad de la piruvatoquinasa.....	74
IV.3.1.A. Fosfoenolpiruvato.....	74
IV.3.1.B. ADP.....	74
IV.3.2. Influencia de la temperatura sobre el comportamiento cinético de la piruvatoquinasa.....	76
IV.3.3. Influencia del pH sobre el comportamiento cinético de la piruvatoquinasa.....	77
IV.4. Moduladores alostéricos: estudio de su efecto sobre la actividad piruvatoquinásica respecto al PEP.....	78
IV.4.1. Influencia de la concentración de efectores.....	78
IV.4.2. Activadores.....	81
IV.4.2.A. Efecto de la F-1,6-P <sub>2</sub> .....	81
IV.4.2.B. Efecto de la F-2,6-P <sub>2</sub> .....	84
IV.4.2.C. Efecto conjunto de las dos hexosas.....	86
IV.4.3. Inhibidores.....	87
IV.4.3.A. Efecto de la fenilalanina.....	87
IV.4.3.B. Efecto de la fosfocreatina.....	89
IV.4.3.B. Efecto conjunto de los inhibidores.....	90
<b>CAPÍTULO V.- RESULTADOS: FOSFOFRUCTOQUINASA.....</b>	<b>92</b>
V.1. Estudios preliminares de la enzima.....	92
V.1.1. Exploración de la fosfofructoquinasa en diversos órganos de lubina.....	92
V.1.2. Propiedades físico-químicas de la enzima.....	92
V.1.2.A. Estabilidad enzimática.....	92
V.1.2.B. Influencia del pH.....	94
V.1.2.C. Influencia de la temperatura.....	96
V.1.3. Propiedades cinéticas de la fosfofructoquinasa.....	96
V.1.3.A. Influencia de la concentración de sustratos sobre la actividad de la enzima.....	96
V.1.3.A.a. Fructosa ó fosfato.....	96
V.1.3.A.b. Complejo MgATP <sup>2-</sup> .....	98
V.1.3.A.b.I. Relación con el Mg <sup>2+</sup> .....	99
V.1.3.A.b.II. Tipo de inhibición por ATP <sup>4-</sup> .....	101
V.1.3.B. Moduladores.....	102
V.1.3.B.a. Efecto de la temperatura.....	102
V.1.3.B.b. Efecto del pH.....	105
V.1.3.B.c. Efectores.....	106
V.2. Purificación e investigación de formas enzimáticas.....	106
V.2.1. Tratamientos previos.....	106
V.2.2. Cromatografía de afinidad.....	107



V.2.3. Cromatografía de filtración en gel.....	107
V.2.4. Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	110
V.2.5. Determinación del peso molecular.....	111
V.3. Estudio cinético de las formas de la enzima.....	112
V.3.1. Comportamiento respecto a sus sustratos.....	112
V.3.1.A. Fructosa 6 fosfato.....	112
V.3.1.B. Complejo $MgATP^{2-}$ .....	114
V.3.2. Complejo $MgATP^{2-}$ y su relación con el $Mg^{2+}$ y el $ATP^{4-}$ libres.....	117
V.3.2.A. Efecto del $Mg^{2+}$ libre.....	117
V.3.2.B. Inhibición por $ATP^{4-}$ libre.....	118
V.3.3. Moduladores.....	119
V.3.3.A. Estudio de los diferentes efectores.....	119
V.3.3.B. Efecto de la F-1,6- $P_2$ .....	122
V.3.3.C. Efecto de la F-2,6- $P_2$ .....	122
V.3.3.D. Efecto del PEP.....	125
 CAPÍTULO VI.- DISCUSIÓN.....	 126
VI.1. Determinación de la concentración intracelular de metabolitos.....	126
VI.2. Piruvatoquinasa.....	129
VI.3. Fosfofructoquinasa.....	138
 CAPÍTULO VII.- CONCLUSIONES.....	 144
 CAPÍTULO VIII.- RESUMEN.....	 146
 CAPÍTULO IX.- BIBLIOGRAFÍA.....	 147

## INTRODUCCIÓN.

## I.- INTRODUCCIÓN.

Los recursos marinos y de agua dulce desde la antigüedad han sido uno de los pilares básicos de la alimentación humana, junto con la ganadería y la agricultura. Sin embargo, y debido fundamentalmente, a la captura incontrolada de las distintas especies, así como a la contaminación creciente, dichos recursos están disminuyendo de forma alarmante. Por otra parte, la población mundial se duplica en la actualidad aproximadamente cada 30 años y paralelamente el área de cultivo terrestre por habitante no podrá crecer en la misma proporción.

Estas perspectivas llevan a buscar nuevas fuentes de producción de alimentos de alta calidad nutritiva y a gran escala. Como consecuencia de esto, la Acuicultura, método de reproducción y crecimiento de animales acuáticos en condiciones controladas, es hoy un sistema básico para compensar la disminución en la producción natural. En la actualidad, la producción pesquera en nuestro país, se encuentra entre las más importantes del mundo y la ingesta de pescado "per capita" es de las más altas, por lo que podemos comprender la trascendencia socioeconómica que en España tiene la Acuicultura como complemento de la pesca.

El nivel de conocimientos que, desde la perspectiva bioquímica, se tiene de los animales terrestres es superior al de los animales acuáticos, ya que éstos forman un grupo muy variado de organismos, situados en diferentes estados evolutivos y en un medio que condiciona de modo decisivo los requerimientos metabólicos.

Es indudable que el estudio de las especies objeto de acuicultivos y su relación con el medio, podrá dar lugar a un aumento progresivo en la productividad de la Acuicultura. Esto hace que el estudio a nivel bioquímico de las rutas metabólicas sea fundamental para la obtención de dietas equilibradas que puedan aplicarse en una mejora de las especies cultivadas.

El conocimiento de las actividades enzimáticas, en lo que se refiere a su caracterización y regulación, ayudará a establecer las bases de una posible modificación de los requerimientos nutricionales de estos animales, de cara a un abaratamiento de los costes de producción. Aunque estas necesidades pueden considerarse cualitativamente las mismas que las que tienen los animales superiores, cuantitativamente surgen diferencias debido a factores intrínsecos y a condicionantes extrínsecos. Las proteínas y los lípidos constituyen la principal fuente de energía de los peces, pero bajo determinadas condiciones pueden utilizar también los hidratos de carbono.

El Departamento de Bioquímica de la Facultad de Veterinaria, desde hace años, ha enfocado parte de su investigación hacia el estudio bioquímico de la trucha arcoiris (*Salmo gairdneri*) y de la lubina (*Dicentrarchus labrax*), como modelos de experimentación de agua dulce y salada, respectivamente. Ambas especies son objeto de investigaciones fisiológicas y bioquímicas, con el fin de adquirir unas bases científicas para una mejor y más rentable producción.

### I.1. -ASPECTOS GENERALES DE LA LUBINA.

La lubina (*Dicentrarchus labrax* L.) es una de las especies marinas de mayor importancia comercial en el continente europeo. Presenta una buena adaptación a las condiciones de cautividad y a diferentes medios salinos, lo que sumado a la relativa facilidad con que se induce la puesta y la alta supervivencia de las larvas, la convierten en una especie muy interesante para el cultivo industrial (Lozano, 1964; Ramos y col., 1982).

Pertenece a la superclase de los peces osteíctios, superorden teleósteos, orden perciformes, suborden pércidos, familia serránidos y género dicentrarchus. En España es también muy frecuente otra especie de este género, la baila (*Dicentrarchus punctatus* B.).

La lubina tiene una amplia distribución en el Atlántico y en el Mediterráneo (Lozano, 1964). Es de filiación preferentemente marina aunque puede penetrar también en aguas continentales, entrando en estuarios y en ocasiones remontando ríos (Burton y Burton, 1978). Vive en aguas muy oxigenadas, por lo que abunda en las costas rocosas batidas por el mar.

#### .-Morfología.

Las lubinas tienen el cuerpo fusiforme y comprimido. La boca es grande, con ligero prognatismo inferior. Los perfiles dorsal y ventral son convexos y posee dos aletas ventrales, dos pectorales, dos pelvianas, una anal y otra caudal. Su color es verdoso o azulado, más marcado en el dorso y en los flancos, con el vientre plateado y una mancha oscura en el opérculo. Las jóvenes poseen motas oscuras en la parte alta de los flancos (Lozano, 1964). Las escamas están marcadas por

un grueso punto plateado. No tienen diferenciación sexual evidente, aunque la hembra tiene la cabeza más larga y menos redondeada que el macho y el cuerpo es algo más alto y grueso.

#### .- Reproducción.

En la zona Mediterránea, las lubinas, alcanzan la madurez sexual a los dos años las hembras y a los tres años los machos. El periodo de reposo de su ciclo sexual es de Marzo a Septiembre, teniendo el periodo de puesta una vez al año, de Diciembre a Marzo. Este periodo se corresponde con el más frío del año (11-14°C) y parece depender también de la luz (Coll Morales, 1983). La puesta la realizan en aguas marinas cercanas a las desembocaduras de los ríos. Los huevos son pelágicos y miden 1-1,5 mm de diámetro. La duración del periodo embrionario y larvario es variable y dependiente de la temperatura. La larva en el momento de la eclosión mide 3,5 mm y está poco desarrollada (Chevrey, 1925; Jackman, 1954). Tienen un periodo de vida pelágico, permaneciendo durante el invierno en el mar para acercarse a la playa y penetrar en los ríos en primavera (Lozano, 1964).

#### .- Régimen alimenticio.

No tienen periodo de ayuno y alimentación bien definido, aunque se alimentan menos de Octubre a Febrero. Según D'Ancona (1970) la composición fundamental de su alimento es : crustáceos y peces (Atlántico y Mediterráneo) y moluscos (en menor proporción en el Atlántico). Los crustáceos son preferentemente decápodos, misidáceos y anfípedos y los peces clupeidos. Se han encontrado vestigios de vegetales en sus estómagos (restos de plantas de fondos marinos) aunque no se conoce su importancia en la dieta.

Ramos y col. (1982) estudiaron y compararon los índices de crecimiento y los factores de conversión nutricionales en lubinas alimentadas con dieta natural y con pienso artificial. Estos investigadores encontraron que los ejemplares alimentados con dieta natural mostraban una velocidad de crecimiento mucho mayor que los que recibieron la dieta comercial. Este hecho indicaba que el pienso carecía o contenía cantidades insuficientes de los factores nutritivos esenciales para el desarrollo normal de la lubina. Sin embargo, curiosamente, algunos ejemplares que no presentaron un crecimiento longitudinal adecuado, sí incrementaron significativamente su peso. El hecho de que a lo largo del experimento no se registrase ninguna mortalidad, permitió a estos autores deducir que, aunque la dieta artificial no era capaz de proporcionar crecimiento de la especie, podría servir como ración de mantenimiento. La diferencia más notable entre ambas dietas era principalmente el alto contenido en proteínas (85,02 % en la dieta natural frente al 55% en la dieta comercial en peso seco) y el contenido de carbohidratos (22,4% en los piensos preparados y en la dieta natural prácticamente nulo).

#### **. - Aspectos fisiológicos.**

Eurihalinidad: La lubina es un pez eurihalino, poco sensible a las variaciones de salinidad (Mateos, 1990). Lassere (1971) trabajó sobre la regulación de la presión osmótica, de esta especie, en agua de mar y dulce, demostrando que los cationes sodio y potasio del plasma variaban dentro de unos límites muy pequeños. Existe pues, un mecanismo regulador sobre la concentración de dichos cationes, bajo la dependencia de una ATP-asa. Esta enzima desempeña un papel muy importante en la osmorregulación de teleósteos, siendo

de especial significado en los peces eurihalinos y su actividad varía dependiendo de la salinidad del medio, incrementándose con la misma. Las lubinas pueden salir directamente del agua dulce al agua salada pero el proceso inverso debe hacerse por etapas.

Euritermia: Los rangos de variación de temperatura en océanos son menos significativos que en estanques o estuarios. En el Mediterráneo varían de 10° a 22° C y en el Atlántico entre 8° y 19°C.

Esta especie parece ser sensible a los cambios térmicos, variando su índice de conversión y su crecimiento con la temperatura (Mateos, 1990). En invierno las lubinas adultas viven a mayor profundidad evitando así las variaciones térmicas diarias. La adaptación a los cambios térmicos podría estar relacionada con el funcionamiento endocrino aunque es lógico pensar que haya, también, algún tipo de adaptación metabólica. La temperatura es la responsable del comienzo de la pubertad y de la rapidez de su crecimiento.

Ramos y col. (1982) estudiaron también el índice de crecimiento en relación con la temperatura. Observaron que, por día, la cantidad de alimento consumido y el incremento de peso, disminuía en proporción directa al descenso progresivo de la temperatura. Este hecho es fácilmente comprensible ya que al ser los peces animales ectotermos, las temperaturas invernales del agua del mar ralentizan su metabolismo, disminuyendo la ingesta de alimento y en consecuencia el crecimiento de la especie.

Fototropismo: Tiene un fototropismo positivo que hace que viva fundamentalmente en los primeros metros



del agua (3-4 m) y raramente a profundidades mayores (5-6 m). Este hábito favorece asimismo la oxigenación, ya que en esta zona existe un gran oleaje, con lo que la concentración de oxígeno disuelto es elevada y constante. También se ha observado que es muy importante el ritmo nictameral en su reproducción.

## 1.2. ORGANIZACIÓN MUSCULAR EN LOS PECES.

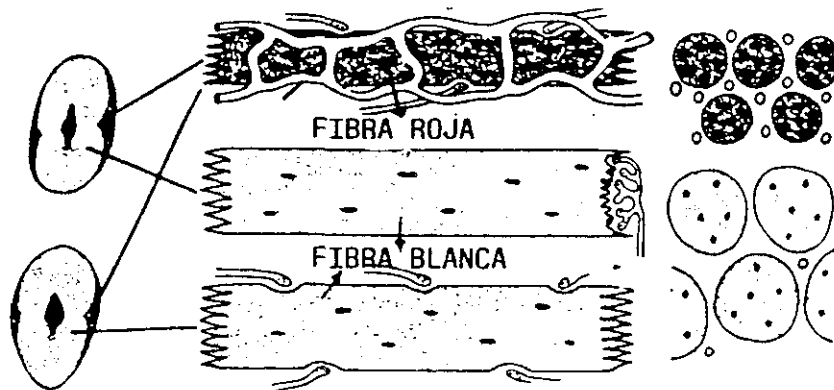
Los peces forman un grupo animal extraordinariamente diverso, no sólo respecto a su evolución filogenética y a sus diferentes tipos de vida, sino también a la gran variedad de ambientes que han colonizado. Hay especies adaptadas a diferente temperatura, salinidad, oxigenación, presión hidrostática, disponibilidad de alimento, etc... Esto condiciona la existencia de una mayor variación en las propiedades del tejido muscular que las que se observan en otros grupos de vertebrados inferiores (anfibios, aves y reptiles) y comparativamente es muy poco lo que se sabe de sus propiedades bioquímicas y contráctiles (Johnston, 1982a).

El tejido muscular ocupa la mayor parte del cuerpo del pez y es el responsable de todos sus movimientos y del mantenimiento de la posición. En la mayoría de los peces, las fibras musculares del miotomo son básicamente de dos tipos (esquema 1), fácilmente distinguibles por su color. Existe una fina capa superficial roja, que cubre casi todo el resto de la masa muscular de color blanco y cada una de ellas posee un tipo diferente de fibras (Bone, 1986).

Las fibras rojas son de pequeño diámetro, funcionamiento aeróbico y están bien vascularizadas (Diedzdrík y Hochachka, 1978); poseen abundantes mitocondrias y son ricas en mioglobina (Patterson y Goldspink, 1972); almacenan lípidos y glucógeno y tienen gran cantidad de enzimas oxidativas y lipolíticas (Bone, 1986). Asimismo, muestran una reducida actividad de la ATP-asa (Johnston y col., 1974). Estas fibras son las que actuarían preferentemente durante la navegación lenta.

Las fibras blancas son de gran diámetro, tienen un funcionamiento anaerobio, están pobremente vascularizadas, con poca mioglobina (Johnston, 1982a; 1981), presentan un reducido consumo de oxígeno y tienen una alta actividad miosín-ATP-asa. Almacenan glucógeno y poseen mayor cantidad de enzimas glicolíticas que las rojas, con mayor actividad fosfofructoquinásica y láctico deshidrogenasa, lo que indica un alto potencial glicolítico (Bone, 1986). Constituyen entre el 80 y el 95 % de la musculatura del animal y se encargan de la navegación rápida.

Aunque en algunos casos ambos tipos de fibras estan interdigitadas, en general, están bien separadas, por lo que los requerimientos metabólicos del músculo quedan bien diferenciados a nivel de los distintos tipos de fibras. Así, el músculo blanco será exclusivamente glicolítico, mientras que en el músculo rojo se podrán producir glicolisis y oxidaciones mitocondriales a través del ciclo de los ácidos tricarboxílicos. De esta forma las fibras rojas consumirían las reservas glicídicas y lipídicas, mientras que las fibras blancas utilizarían glucógeno en cantidades más significativas (Bone, 1978).



Esquema 1.- Distribución de los tipos de fibras y estructura e inervación de las mismas en el miotomo de peces teleósteos. (Tomado de "Biology of fishes" Q.Bone, 1986).

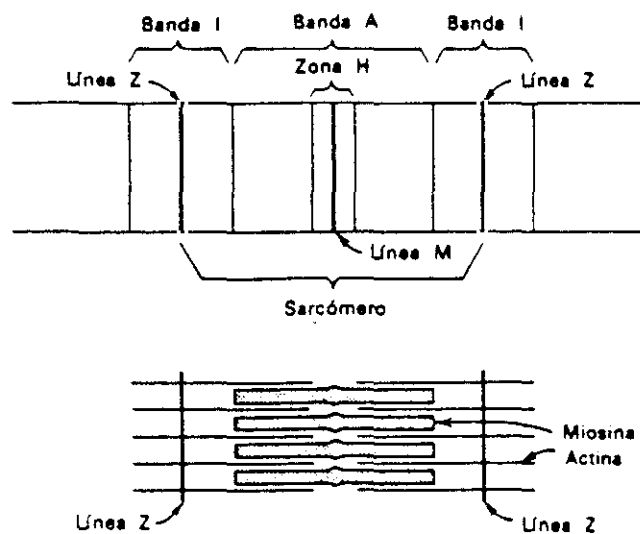
Cada tipo de fibra posee diferente inervación. Las rojas tienen inervación colinérgica distribuida, mientras que la blanca podría tenerla bien distribuida o bien focal (Bone, 1986). La separación de sus funciones se da a nivel de la cuerda espinal y parece probable que la diferente activación de los sistemas se deba a diferentes niveles de excitabilidad del conjunto de sus motoneuronas o a diferentes vías neuronales (Hudson, 1973).

Se ha descrito un tipo de fibras intermedio que se denominan fibras rosas (Johnston y col., 1977) con una mayor actividad ATP-asa y una menor capacidad oxidativa que las fibras rojas. Hudson (1973) describe también un tipo de músculo en mosaico, con un 80-90% de fibra roja, diferenciado de la línea lateral del músculo rojo, que estaría relacionado con una función de transición entre la velocidad de natación y la de crucero.

Las células musculares están adaptadas para realizar trabajo mecánico por contracción unidireccional. Al igual que en el resto de los vertebrados, tienen un aspecto estriado al microscopio debido a las miofibrillas que contienen (Patterson y Goldspink, 1976). Las miofibrillas ocupan la mayor parte de la fibra muscular y dejan pequeñas cantidades de sarcoplasma que contiene los núcleos, el retículo sarcoplásmico y las mitocondrias o sarcosomas. Un sarcolema polarizado rodea la fibra, que es activada a nivel de la placa neuromuscular.

Las miofibrillas son el resultado de la repetición de los sarcómeros (unidad fundamental). Al microscopio electrónico muestran un aspecto de bandas oscuras y claras que se alternan (esquema 2). La miofibrilla está

compuesta por filamentos gruesos y finos. Las bandas claras (bandas I) contienen sólo filamentos finos, unidos a un disco delgado desde el que se extienden (línea Z), que marca el límite entre cada sarcómero. Las bandas oscuras (bandas A) son interdigitaciones de filamentos gruesos y finos; en su centro tiene una zona más clara (zona H) formada sólo por filamentos gruesos y se divide en dos partes por una línea oscura (línea M).

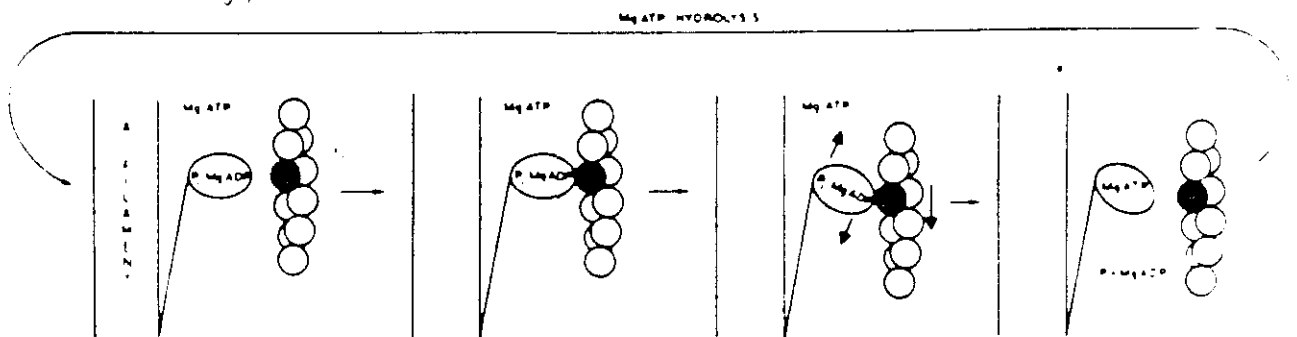


Esquema 2: Representación diagramática de la estructura de una miofibrilla. (Tomado de "Bioquímica" de Devlin, 1998).

Los filamentos gruesos contienen preferentemente miosina y los delgados actina, tropomiosina y troponina. La línea Z contiene  $\alpha$  actinina y la M creatinaquinasa, miomesina y proteína M.

Durante la contracción, las bandas I se acortan a causa del deslizamiento de los filamentos delgados hacia la banda A y zona H. El fenómeno de la contracción se basa en la actividad ATP-asa de la miosina que produce la energía necesaria para el trabajo muscular (Johnston y Moon, 1981; Johnston y col., 1975).

Los acontecimientos que tienen lugar en la contracción del músculo se inician en el nervio motor que transmite un impulso eléctrico al músculo, a la unión neuromuscular, donde se libera acetilcolina. El impulso se extiende sobre el sarcolema, que se despolariza, lo que hace que entre  $\text{Na}^+$  a la célula y se pierda  $\text{K}^+$ . El túbulo transversal se despolariza también y transmite el impulso a todas las miofibrillas de la fibra. Esto hace que se libere  $\text{Ca}^{2+}$  que se une a la troponina, la cual sufre un cambio conformacional reconocido por la tropomiosina. Ésta cambia su posición relativa con la actina, quedando expuestos los sitios de fijación de la miosina. El complejo ATP-miosina se convierte en ADP-Pi-miosina, que se combina con la actina para formar actomiosina con la liberación de ADP y Pi (Esquema 3). Durante este ciclo sólo se genera fuerza mientras el puente de miosina está unido al centro de fijación de la actina. (Van Pielsen, 1988; Perry, 1977).



Esquema 3: Esquema simplificado de la secuencia de acontecimientos que suceden durante la contracción muscular para producir la hidrólisis del ATP en ADP. (Tomado de "Regulation of contractile activity in muscle" de S.V. Perry, 1977).

La concentración de ATP existente en el músculo en reposo es insuficiente para mantener una contracción intensa y prolongada. La reserva energética en la contracción es la fosfocreatina, que mediante la acción de la creatinaquinasa transfiere un grupo fosfato al ADP para formar ATP.

### I.3. METABOLISMO DE CARBOHIDRATOS EN PECES: GLICOLISIS

Las rutas metabólicas estudiadas en el metabolismo intermediario de peces son similares a las de los mamíferos, sin embargo existen diferencias en cuanto a la presencia e importancia fisiológica de alguna de ellas. El metabolismo de carbohidratos proporciona energía, precursores para las reacciones biosintéticas y potencial de oxido-reducción para convertir a los precursores en intermediarios o productos finales para su incorporación en los componentes celulares. Si bien su principal función metabólica es la producción de energía, hay que considerar que en estos organismos es menos necesaria que en otras especies animales, debido a que no deben mantener su temperatura corporal constante, consumen menos energía para mantener su posición y el movimiento, eliminan sus desechos nitrogenados como amonio y requieren menos energía para la síntesis de proteínas (Lovel, 1979). A pesar de lo expuesto, es indudable que los peces necesitan energía y serían los hidratos de carbono la forma más barata de obtenerla, lo que hace que sea fundamental el estudio de su metabolismo y su posible aplicación al diseño de dietas.

Al igual que ocurre con las especies de agua dulce, existe poca información acerca de las necesidades y requerimientos de glúcidos por los peces marinos. En estos se han observado desórdenes graves (mortalidad, hepatomegalia e hiperglucemia) como consecuencia de la incorporación a la dieta de diferentes tipos de glúcidos en proporción que supere el 12% (Zamora y Echevarria, 1987). Sin embargo, en lubina su supresión total en la dieta (Alliot y col., 1979) produce menores incrementos de peso y peor utilización de la misma.

La dieta natural de los peces posee poca cantidad de carbohidratos, aunque todas las especies estudiadas han demostrado capacidad para utilizarlos como fuente energética (Cowey y Seargent, 1977; Walton y Cowey, 1982). En salmónidos se han caracterizado enzimas digestivas, como la  $\alpha$ -amilasa (Ushiyama y col., 1965) y enzimas que hidrolizan los disacáridos (Nagayama y Saito, 1969). Asimismo, Smith (1971) ha determinado la eficacia relativa de absorción de carbohidratos estableciendo el orden siguiente: Monosacáridos > disacáridos > polisacáridos.

Una de las diferencias fundamentales entre peces y mamíferos respecto al metabolismo de carbohidratos, se refiere a la regulación endocrina, ya que se ha descrito que en los peces hay una intolerancia a la administración de glucosa por vía oral (Epple, 1969), que es comparable a la intolerancia sintomática de la diabetes en mamíferos. Debido a que la característica del estado endocrino en peces es el hipoinsulinismo, Palmer y Ryan (1972) y Thorpe e Ince (1976) han propuesto que los niveles de insulina en trucha están regulados, no por la glucemia sino por los niveles de aminoácidos en sangre.

Diversos autores han observado que la glicolisis es operativa en diferentes tejidos de peces (Knox y col, 1980; Hochachka, 1968; Freed, 1971). Utilizando varias especies (trucha, platija y bacalao) Knox y col. (1980) comprobaron que todas las enzimas de la ruta glicolítica son operativas en los diferentes tejidos con el orden siguiente : Músculo > corazón = cerebro > riñón = branquias > hígado. Si bien, la actividad de las enzimas de la glicolisis son notoriamente inferiores a la de mamíferos.



En la secuencia glicolítica hay tres pasos enzimáticos fisiológicamente irreversibles, que son los catalizados por la hexoquinasa (HK), fosfofructoquinasa (PFK) y piruvatoquinasa (PK). Estas tres reacciones exclusivas de la glicolisis constituyen barreras energéticas que impiden que el proceso pueda tener lugar en el sentido inverso. En la gluconeogénesis estos pasos se soslayan por la glucosa-6 fosfatasa, fructosa-1,6-bisfosfatasa y la actividad combinada de la piruvatocarboxilasa y la fosfoenolpiruvatocarboxiquinasa respectivamente.

La HK, enzima que cataliza la etapa inicial de la utilización de glucosa, tiene una actividad muy débil en todos los peces en relación con las restantes enzimas glicolíticas (Mc Leod, 1963, Diezdrizic y Hochachka, 1978). Fideu y col. (1983) observan que en el hígado de lubina la actividad de HK es menor (25 veces) que la correspondiente a la PFK, que a su vez es menor (20 veces) que la actividad de la PK. La baja actividad de la HK, junto con el pequeño valor de su  $K_m$  podrían ser un índice de la escasa utilización de la glucosa y la baja velocidad glicolítica en peces. La mayoría de los animales, tienen en el hígado una glucoquinasa inducible (HK IV) que tiene especificidad por la glucosa. Se han detectados isoenzimas diferentes de HK en peces, pero ninguna correspondiente a la glucoquinasa. La ausencia de actividad glucoquinásica junto con las características de la HK en peces, mencionadas anteriormente, es lo que podría producir una acumulación de glucosa al alimentarlos con dietas ricas en carbohidratos. (Walton y Cowey, 1982; Dobson y col., 1987)

En cuanto a la PFK, Shibata (1977) señala que los animales acuáticos, en general, presentan una actividad baja en relación con las restantes enzimas glicolíticas,

lo cual implicaría que como en la mayoría de los organismos, la PFK podría ser el principal punto de control de la glicolisis. La glucosa llega muchas veces ya fosforilada a la vía glicolítica con lo cual esta sería realmente la primera enzima control de la ruta.

La débil actividad de la triosafofato isomerasa marca otra diferencia notable del metabolismo en peces (Nichols y col., 1976; McLeod y col., 1963), que podría traducirse en una velocidad más reducida de la glicolisis, ya que en peces, como en mamíferos, la proporción de dihidroxiacetona fosfato es mucho mayor que la de gliceraldehído-3-fosfato (sustrato útil para la continuidad de esta ruta). Por otro lado las variaciones en los niveles enzimáticos, causados por los cambios estacionales, en gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, podría indicar, asimismo, un cierto papel regulador de esta enzima en el proceso glicolítico en peces (Shibata, 1977).

Otra de las posibles vías de utilización de la glucosa es el ciclo de las pentosas fosforiladas. Es activa en hígado y riñón de varias especies de peces, presentando en hígado de lubina una actividad alta (Bautista y col., 1984) y provee el poder reductor (NADPH) necesario para la biosíntesis de lípidos. Se ha observado actividad de esta vía en eritrocitos de perca amarilla (Bachand y Leray, 1975); necesaria también para la reducción del glutatión que proporcione una adecuada protección de la hemoglobina e impida la acumulación de metahemoglobina.

.- Influencia de la temperatura.

Como ya hemos indicado, los requerimientos de energía en los peces, por ser ectotermos, son inferiores

a los de los mamíferos y otros organismos homeotermos, los cuales tienen que mantener constante la temperatura de su cuerpo.

En los animales ectotermos la temperatura varía en relación con la del medio en que se encuentran, lo que hace que la contribución de las diferentes vías metabólicas, la velocidad de algunas reacciones metabólicas y la participación de los distintos sustratos para la producción de energía, se vean afectados por la temperatura del ambiente.

Las reacciones metabólicas están controladas no sólo por el cambio de temperatura, sino por la magnitud y el sentido de dicho cambio. Un notable y súbito aumento de la temperatura puede ser letal debido a un desequilibrio en el transporte de los gases respiratorios. Sin embargo, una pequeña variación de este parámetro es mucho menos traumática, teniendo estos organismos capacidad de aclimatación dentro de un amplio rango térmico (20-30°C) con variaciones de 1°C por día.

En relación con la influencia de la temperatura en el metabolismo de hidratos de carbono existe cierta controversia, los primeros estudios realizados indicaban que a temperaturas elevadas la gluconeogénesis y la vía de las pentosas fosforiladas son mucho más efectivas que la glicólisis, la cual permanece constante o ligeramente disminuida (Hochachka, 1968). Por el contrario, estudios realizados por Freed (1971) en músculo de carpa, parecían mostrar una reducción de la actividad glicolítica a bajas temperaturas. Datos más recientes indican que la glicólisis, en músculo de trucha y dorada, es fuertemente activada en la adaptación a bajas temperaturas (Yamawaki, 1983; Phelan y Gray, 1984). Sin embargo, Seibert (1985) observó en hepatocitos aislados

de trucha, claras diferencias en la producción de glucosa y en el metabolismo del glucógeno, controlados por cambios térmicos de manera semejante a la descrita anteriormente por Hochachka (1968).

Se define como "óptimo térmico" el intervalo de temperatura en el cual los valores de la  $K_m$  son mínimos dentro de los márgenes fisiológicos de temperatura para las especies, de tal manera que la enzima presente la máxima afinidad por su sustrato a temperaturas que coinciden con las del entorno del animal; lo que parece tener un significado regulador.

Asimismo, en el caso de los organismos ectotermos, la temperatura puede jugar un papel análogo a un efector positivo sobre las enzimas reguladoras aumentando su afinidad. Una consecuencia importante de esta respuesta a la variación térmica es que a bajas concentraciones de sustrato, la actividad catalítica es mayor a bajas temperaturas. Cuando la concentración de sustrato es superior al valor de la  $K_m$  la actividad catalítica es mayor a altas temperaturas. Estas propiedades son importantes para el control metabólico durante las fluctuaciones térmicas ambientales de los ectotermos, ya que les proporciona un mecanismo por el cual la velocidad de reacción puede desarrollarse relativamente independiente de la temperatura, al menos bajo condiciones limitantes de sustrato (Hochachka, 1968).

Parece ser que evolutivamente las enzimas de organismos acuáticos se han adaptado a la temperatura por una serie de mecanismos como: máxima afinidad para los ligandos a temperaturas correspondientes con el hábitat natural; baja energía de activación para compensar las bajas temperaturas; un "óptimo térmico" que conduce a velocidades máximas y propiedades

reguladoras independientes de la temperatura. Se ha sugerido que el primer mecanismo citado, que es el más característico, es el más operativo tanto en procesos de evolución como en procesos largos de aclimatación. En este último proceso se encuentran implicados al menos dos mecanismos de control: el nivel de isoenzimas preexistentes en la célula y la funcionalidad de las mismas, adecuadas al intervalo de temperatura ambiental.

Las interacciones enzima modulador, y en particular enzima-adenilato, parecen ser menos dependientes de la temperatura, con el fin de mantener el nivel de actividad enzimática, lo cual parece lógico ya que los adenilatos son sustratos comunes para muchas enzimas y por lo tanto muy poco específicos. Sin embargo, para otros moduladores más específicos, si se ha encontrado variación con la temperatura.

De todo lo expuesto anteriormente se puede decir que las enzimas de los peces muestran marcadas diferencias con las de los mamíferos.

#### .- Importancia de la glicolisis en la función muscular.

El metabolismo anaerobiótico en peces es cualitativamente diferente al de los mamíferos (Bilinski, 1975). Algunos autores han demostrado que durante la anaerobiosis se produce  $\text{CO}_2$  y  $\text{NH}_4^+$  y pueden utilizar además las proteínas para desarrollar energía para el trabajo muscular. Resistir la anaerobiosis es muy importante en el ciclo biológico de algunos grupos de peces. Diedrizio y Hochachka (1978) explicaron la lenta velocidad en la acumulación del lactato observada en el músculo blanco de algunos peces, como la carpa, durante la hipoxia, mediante la existencia de vías alternativas anaeróbicas además de la glicolisis, como ocurre en el

músculo de numerosos organismos anaerobios facultativos. Johnston (1975a) lo justifica considerando que los carbohidratos y los aminoácidos se usan simultáneamente dando gran variedad de productos finales.

En el trabajo de alta intensidad (anaeróbico) realizado por el músculo blanco de los teleósteos se utilizan tres fuentes de energía endógena (glucógeno, fosfocreatina y ATP) aunque las interacciones entre las vías metabólicas que las movilizan no están aún bien estudiadas (Hochachka, 1985)

Distintos autores han descrito que durante tiempos cortos de intensa actividad muscular se produce una rápida formación de ATP, acompañada de un proceso anaeróbico de hidrólisis de fosfocreatina y glucogenólisis, aunque todos estos fenómenos dependen de la intensidad y de la duración de la contracción, de los mecanismos de regulación que controlan el flujo glicolítico y de la resistencia específica de cada fibra muscular a la fatiga. Tradicionalmente, en el estado de fatiga debido a un trabajo intenso, estos cambios se asociaban a la acumulación de iones hidronio. Por el contrario, Dobson y col. (1987) consideran que la disminución del pH intracelular en el músculo de peces en ejercicio no afecta al funcionamiento de las enzimas glicolíticas, como por ejemplo la fosfofructoquinasa.

En la fatiga (incapacidad para mantener una velocidad ligeramente superior a la velocidad máxima del estado estacionario en condiciones aeróbicas) parece claro que los puntos de control en la ruta glicolítica son la HK, PK Y PFK. En reposo no se observa la capacidad reguladora de la HK, pero en la fatiga la G6P disminuye mucho, lo que produce una desinhibición de la actividad hexoquinasa. También se observa que hay un

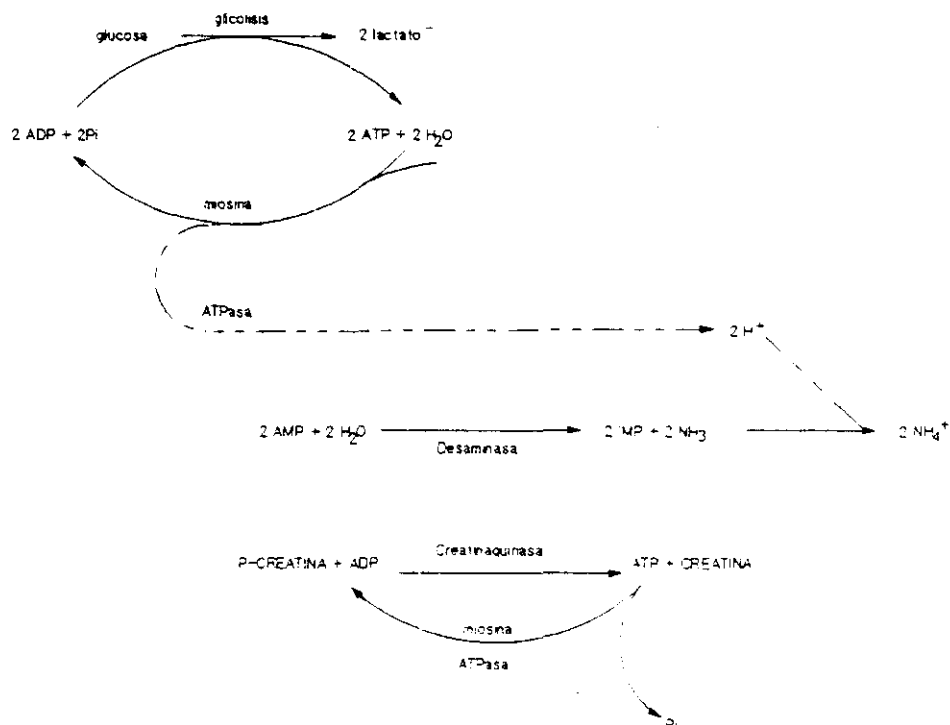
aumento de la F6P y una disminución de la F-1,6-P<sub>2</sub>, ya que la F6P se produce más rápidamente de lo que puede transformar la PFK. También se ha relacionado la fatiga con una mayor inhibición de la PFK por el ATP al disminuir el pH, pero parece poco probable ya que en peces en este estado hay una disminución notable del ATP en comparación con el resto de vertebrados y además se incrementa mucho la concentración de moduladores positivos de la enzima (Dobson y col. 1987).

En salmónidos en el momento de la estenuación (imposibilidad del pez para mantener cualquier velocidad dada) no se observa ningún punto de control porque hay un descenso muy pronunciado de todos los intermediarios glicolíticos y de nucleótidos de adenina (Dobson y col. 1987; Dobson y Hochachka, 1987).

Se ha observado que durante el funcionamiento muscular hay dos fases en la producción de lactato y protones relacionados con los periodos de deplección del ATP (trabajo) y de recuperación del ATP (recuperación muscular) y ambos coinciden con periodos de flujo glicolítico en el músculo blanco de peces (Dobson y Hochachka, 1987). Se cree que la estimulación glicolítica se realiza vía activación de la fosfofructoquinasa, piruvatoquinasa y gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa. Tanto el ATP como la fosfocreatina inhiben estas tres enzimas y su concentración disminuye con el trabajo muscular.

Como ya hemos indicado, los estudios realizados sobre el metabolismo de músculo blanco de peces durante el ejercicio muestran tres fuentes potenciales de generación de energía. De la movilización anaeróbica de estos compuestos se producen al menos seis metabolitos mayoritarios: anión lactato, protones, amonio, creatina,

Pi e IMP (Dobson, 1986; Parkhouse, 1986; Dobson y Hochachka, 1986).



Esquema 4: Resumen del metabolismo anaerobiótico en músculo y formación del ATP a partir de la creatina fosfato (Tomado de "Role of glycolysis in adenilate depletion and repletion during work and recovery in teleost white muscle" de Dobson y Hochachka, 1987).

La acumulación de al menos tres de estos productos finales tienen gran importancia, ya que el  $\text{P}_i$  y el amonio son conocidos activadores de la PFK (Dobson y col., 1986), mientras que el IMP puede ser un activador de la glucogenofosforilasa b. Estos productos por sí mismos pueden incrementar la glicólisis para producir el ATP que es necesario para seguir nadando.

También la alanina y el malato se producen como productos finales (Hochachka, 1985) aunque son minoritarios, pero su acúmulo puede producir modificaciones en las concentraciones de productos intermediarios del ciclo de Krebs.



Hochachka y col. (1975) proponen, en músculo rojo de trucha, un mecanismo que implique la reducción de fumarato acoplada con un sistema de transporte de electrones y/o la movilización de glutamato vía  $\alpha$ -ceto-glutarato a succinil-CoA. Ello supondría una ventaja energética sobre la glicolisis clásica, ya que se obtiene una producción extra de moléculas de ATP. En músculo blanco no se ha encontrado aumento del succinato, aunque sí un ligero aumento de la concentración de alanina como producto final. Estas diferencias se piensa que puedan ser debidas al contenido mitocondrial (la relación de mitocondrias entre músculo rojo y blanco es de 7 a 3) (Yamawaki, 1983; Waskoma y Johnston, 1981).

Durante la recuperación, sigue existiendo lactato, aunque aumenta el glucógeno debido a que el músculo ocupa la mayor parte del organismo y se difunde desde el plasma la glucosa procedente del hígado (Randall y Daxboeck, 1982). Esta alta disponibilidad de sustrato favorece la glicolisis en el músculo blanco en el periodo de reposo, de acuerdo con el siguiente esquema:

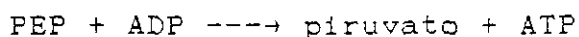
glucógeno del hígado  $\rightarrow$  glucosa del hígado  
 $\rightarrow$  glucosa del plasma  $\rightarrow$  metabolismo muscular.

Se podría decir que todo este incremento en la actividad de la glicolisis se debería a la necesidad de almacenar ATP para la contracción muscular.

#### I.4. PIRUVATOQUINASA.

La piruvatoquinasa (ATP: piruvato-2-fosfotransferasa, E.C.2.7.1 1.40) es una enzima clave en el metabolismo, que cataliza la reacción entre fosfoenolpiruvato (PEP) y ADP, dando piruvato y ATP.

PK



Responsable del mantenimiento de un balance dinámico entre glicolisis y gluconeogénesis, su papel regulador aparece claramente cuando se considera su posición en el conjunto metabólico celular: por una parte, produce energía durante el catabolismo de la glucosa, y por otra puede considerarse como única vía entre dos compuestos, PEP y piruvato, localizados en puntos claves del metabolismo. A este respecto, se debe tener en cuenta que la PK, enzima clave en la encrucijada metabólica del PEP, puede jugar un papel importante además en la formación del ácido pirúvico procedente de las triosas fosfato que a su vez, también se pueden originar en la ruta de las pentosas fosfato.

La PK ha sido descrita como una de las enzimas reguladoras del metabolismo glucídico en diversos organismos y tejidos de mamíferos, (Seubert y Schoner, 1971), peces (entre los que se encuentra la lubina) y aves (Guderley y Cardenas, 1980a; Fideu y col., 1985c, 1986), bacterias (Cornish y Johnson, 1971), mastocitoma (Ngo y col., 1983). Esta enzima cumple con dos criterios para considerarla reguladora ya que cataliza una reacción irreversible, con un gran descenso de energía libre, y su actividad es modificada por compuestos que no guardan relación estructural con el sustrato. Este

papel regulador implica que esté sometida a numerosos mecanismos de control (Dixon y Webb, 1979).

Las actividades de la PK y la PFK están ampliamente coordinadas mediante un acoplamiento entre los productos y sustratos de ambas. El ADP producido en la reacción catalizada por la PFK es uno de los sustratos de la PK y a su vez el ATP que se produce en la reacción catalizada por esta enzima es el sustrato de la PFK. Además la F-1,6-P<sub>2</sub>, producida en la reacción de la fosfofructoquinasa es un notable activador de la PK.

La mayoría de las piruvatoquinasas de mamíferos están constituidas por subunidades con un peso molecular de 50.000 a 60.000 daltons, siendo generalmente la forma activa un tetramero (Hall y Cottan, 1978; Munday y col., 1980). Se han descrito también formas activas triméricas y pentaméricas (Giles y col., 1976a), e incluso de un grado de polimerización mayor (Reinhart, 1983; Sand, 1984).

En relación con sus propiedades catalíticas la piruvatoquinasa, como todas las quinasas, transfiere grupos fosfato, siendo mayor la especificidad con el sustrato donante (PEP) que con el aceptor (ADP) (Kayne, 1973; Munday y col., 1980).

La sensibilidad de la piruvatoquinasa a varios cationes ha sido postulada como mecanismo de control. Así, la enzima requiere no solo cationes divalentes como el magnesio o el manganeso, sino también monovalentes como el potasio o el amonio para su actividad (Abbe y Yamoda, 1982; Leon y col., 1982; Behn y Bryant, 1980; Ainsworth y Mcfarlane, 1973). En algunos casos ambos tipos de cationes actúan como activadores (Hunsley y Sulter, 1969; Ainsworth y Mcfarlane, 1973). Algunos

autores proponen como verdaderos sustratos de la reacción las formas queladas de magnesio y nucleótidos (Kayne, 1973; Munday y col., 1980)

Se ha descrito que la modulación de la actividad de esta enzima en mamíferos es debida a un proceso de fosforilación-desfosforilación (Engstron, 1978). Este efecto también se ha observado en piruvatoquinasa de mejillón (Ibarguren y col., 1989) y parece muy probable que pertenezca al grupo de enzimas cuya actividad sea regulada por fosforilación bajo la influencia del adenosín monofosfato cíclico (AMPc); siendo más activa la forma fosforilada que la desfosforilada.

Al igual que en otras enzimas glicolíticas, la regulación de la actividad de la piruvatoquinasa se puede ejercer mediante la existencia de diferentes formas isoenzimáticas. En tejidos de mamíferos se han descrito cuatro isoenzimas de PK (Cardenas y col., 1975; Hall y Cottan, 1978; Imamura y Tanaka, 1982), designadas como M ( $M_1$ ), K ( $M_2$ ), L y R. Estas isoenzimas difieren en su distribución en los tejidos y en sus propiedades cinéticas, reguladoras e inmunológicas (Guderley y col., 1989). Cinéticamente las isoenzimas de PK entran en dos grupos (Moss, 1982), la M presenta cinética michaeliana mientras que las otras tres son alostéricas. Estructuralmente todas son tetrámeros, existiendo homopolímeros de todas, excepto en la R (mayor componente de eritrocitos) (Peterson y col., 1974). La L (mayor componente del hígado) es fuertemente regulable y muestra cinética sigmoidal respecto al PEP, inhibición por ATP y alanina y activación por F-1,6- $P_2$ . La K (mayor componente de riñón) muestra curvas de saturación ligeramente sigmoidales respecto al PEP, se inhibe por alanina y se activa por F-1,6- $P_2$ . La M (músculo y

cerebro) tiene cinética hiperbólica y no manifiesta propiedades reguladoras (Noguchi y col., 1986).

En peces, el tipo M ha sido descrito en músculo esquelético y cardíaco de salmón, aunque es la forma K la que predomina en el resto de los tejidos (Moon y Hulbert, 1980; Guderlay y Cardenas, 1980 b). Sin embargo estudios sobre PK de músculo rojo de esturión y carpa muestran un comportamiento semejante a la isoenzima L de mamíferos (Randall y Anderson, 1975; Johnston, 1975).

Las isoenzimas de piruvatoquinasa de peces muestran importantes diferencias comparadas con las de los mamíferos. Generalmente la PK de músculo, es activada por F-1,6-P<sub>2</sub> y presenta cooperatividad positiva respecto al PEP (Moon y Hulbert, 1980a y b; ; Roberts y Anderson, 1985; Sand, 1988). Estas características con respecto al PEP de la PK de músculo de vertebrados inferiores (peces, anfibios y reptiles) (Munday y col., 1980) son probablemente un gran soporte fisiológico para la regulación de la glicólisis de estos animales. Por el contrario las isoenzimas de hígado se encuentran sometidas a una menor regulación; en algunas especies no son activadas por F-1,6-P<sub>2</sub> (Somero y Hochachka, 1968) y en anguila americana (*Anguilla rostrata*) (Moon y Hulbert, 1980b) no se ha encontrado sensibilidad a ningún efector. Así, la teoría del control que ejerce esta enzima sobre la gluconeogénesis en el hígado no tendría significado en estas especies. El papel que desempeña este órgano en los mamíferos, en la regulación del balance de carbohidratos, puede ser que en los peces sea realizado por otro tejido, como podría ser el músculo rojo (Hulbert y Moon, 1978).

Como se ha citado, la piruvatoquinasa de músculo de peces es activada por la F-1,6-P<sub>2</sub>, a diferencia de lo

observado en vertebrados superiores (aves y mamíferos) (Zammit y col., 1978). Este efecto es suficiente para revertir la inhibición de sus moduladores negativos (Munday y col., 1980). Zammit y col. (1978) postulan que la falta de activación por la F-1,6-P<sub>2</sub> en vertebrados superiores se debe a la aparición de un sistema circulatorio doble y completo que forma parte de un sistema eficiente para suministrar oxígeno al músculo. Por otra parte, otra hexosa bifosforilada, la fructosa 2,6 bifosfato, ha mostrado también un efecto activador sobre la piruvatoquinasa de algunos orígenes (Van Scaftingen y col., 1985 y Miyatake y col., 1986) aunque su efecto no ha sido aún estudiado en los peces.

Para la piruvatoquinasa de músculo esquelético de peces e invertebrados marinos, se ha descrito inhibición de tipo competitivo mixto respecto al PEP por fenilalanina, alanina y valina (Johnston, 1975; Munday y col., 1980). Otros inhibidores descritos son el ATP (Guderley y Cardenas, 1980b; Kayne, 1973), fosfato de creatina y fosfato de arginina (Kemp, 1973; Munday y col., 1980; De Zwaan y Ebberink, 1978).

El pH óptimo de esta enzima, en peces, se encuentra dentro del intervalo de 7 a 8 (Randall y Anderson, 1975; Johnston, 1975 b; Fideu y col., 1985c). La activación por F-1,6-P<sub>2</sub> según Somero y Hochachka, 1968, no depende del pH en un intervalo de 6,5 a 7,5; aunque por el contrario, en músculo blanco y rojo de anguila (Randall y Anderson, 1975) y en hígado de lubina (Fideu y col., 1985c), sí se ha observado una dependencia del efecto activador de este compuesto al variar el pH. La acción de los inhibidores ATP y fenilalanina parece que tampoco se modifica por el cambio de pH (Moon y Hulbert, 1980b).

Como ya se ha señalado la temperatura actúa como un modulador en los organismos ectotermos. En piruvatoquinasa de músculo de esturión se ha observado una disminución en el coeficiente de Hill respecto a PEP cuando decrece la temperatura (Randall y Anderson, 1975), al igual que ocurre en otros organismos ectotermos (Guppy y Hochachka, 1979). La piruvatoquinasa de músculo blanco de anguila también presenta un aumento de la afinidad respecto al mismo sustrato a temperaturas bajas dependiente del pH (Roberts y Anderson, 1985). En hígado de lubina se ha observado que aumenta la afinidad y la cooperatividad al disminuir la temperatura respecto al PEP y no presenta termorregulación respecto a su otro sustrato, ADP (Fideu y col., 1986). Normalmente el efecto de la temperatura sobre los diferentes moduladores de la piruvatoquinasa no es muy marcado. Esta independencia de los efectores respecto a la temperatura sugiere que estos controles de la actividad piruvatoquinásica son igualmente activos dentro del intervalo de temperaturas del hábitat normal de estos animales (Somero y Hochachka, 1968).

En general, un análisis de los datos cinéticos de la PK de diferentes tejidos de peces revelan cooperatividad con el sustrato PEP y propiedades reguladoras semejantes a las encontradas en los tipos PK-K y PK-L de mamíferos; también Gaitan y col. (1983) observan una forma híbrida K-M para eritrocitos de trucha y Fideu y col. (1986) en hígado de lubina describen unas propiedades cinéticas y reguladoras similares a las de la clase L de mamíferos aunque posea también algunas características de la forma K. Esto podría indicar que la PK de peces probablemente tenga propiedades estructurales que sean reminiscencias del precursor evolutivo de las tres isoenzimas de mamíferos (Guderley y Cardenas, 1980b).

## I. 5. FOSFOFRUCTOQUINASA.

La fosfofructoquinasa (PFK) (ATP: D-fructosa-6-fosfato 1 fosfotransferasa EC. 2.7.11.1) cataliza la fosforilación de la F6P mediante el ATP para formar F-1,6-P<sub>2</sub> y ADP. Esta enzima juega un papel central en la regulación de la glicolisis en la mayoría de los organismos estudiados (Bloxhan y Lardy, 1973; Uyeda, 1979; Sols y col.; 1981).

En estos últimos años los conocimientos sobre la PFK han sufrido notables cambios debido al descubrimiento de la F-2,6-P<sub>2</sub> descrito como el más notable activador de la enzima. A la luz de este descubrimiento se han definido otras dos formas enzimáticas con actividad fosfofructoquinásica que catalizan reacciones distintas a la anteriormente citada, a la que también se denomina PFK-1:

- PFK-2 (ATP: D-fructosa-6-fosfato 2 fosfotransferasa) (Furuya y Uyeda, 1981; Van Schaftingen y Hers, 1983; Hue y col., 1981) que es la responsable de la formación de F-2,6-P<sub>2</sub> a partir de F6P y ATP. Es una enzima bifuncional, con actividad F-2,6-P<sub>2</sub>-asa que se encarga de su degradación.

-PP<sub>i</sub>-PFK (pirofosfato: D-fructosa-6-fosfato 1 fosfotransferasa) que cataliza la formación de F-1,6-P<sub>2</sub> a partir de F6P y PP<sub>i</sub> en las plantas y en algunos microorganismos (Reeves y col., 1974; Macy y col., 1978; Carnal y Back, 1979).

En determinadas circunstancias la glucosa puede llegar a la glicolisis ya fosforilada, esto ha hecho que algunos autores consideren a la fosfofructoquinasa, como la primera enzima clave de esta ruta, capaz de regular



su flujo según las necesidades energéticas de la célula. Este papel regulador de la enzima, ya se sospechaba en 1943, cuando Elgerhart y Sakov vieron que el efecto Pasteur se debía a la inhibición aeróbica de la reacción catalizada por la PFK. Estudios previos de Cori (1942) ya habían indicado el papel limitante de esta enzima sobre la actividad glicolítica.

La PFK de peces, se comporta en líneas generales como la de mamíferos aunque muestra diferencias cuantitativas y cualitativas en cuanto a la acción de sus moduladores y sobre todo a su termorregulación. (Freed, 1971; Houston y col., 1970; Jorgesen y Mustafa, 1980; Jensen, 1981; Leaver y Burt, 1989).

La mayoría de las PFK están constituidas por subunidades de peso molecular  $85.000 \pm 5.000$ , siendo normalmente activa cuando se encuentra en forma de tetrámero e inactiva en su forma dimerica (Frieden y col., 1976). Estas subunidades pueden agruparse formando polímeros que exceden del millón (Dunaway, 1973), e incluso se han encontrado diferentes tendencias a formar agregados de la enzima en distintos tejidos de un mismo organismo (Uyeda, 1979). Petigrew y Frieden (1979a y b) proponen que las formas activas e inactivas corresponden a formas no protonadas y protonadas respectivamente.

Se sabe que para muchos vertebrados la PFK purificada de músculo esquelético posee una disgregación de tetrámeros a dímeros a medida que disminuye el pH bajo unas determinadas condiciones de temperatura. Cuando hay una alcalinización en el medio los dímeros se agrupan en tetrameros. Esto ha dado lugar a que diversos autores (Hand y Somero, 1983, 1984; Hand y Carpenter, 1986), postulen una regulación "in vivo" de la PFK dependiente del pH. Otros autores (Dobson y col., 1986;

Hesterberg y Lee, 1982; Luther y col., 1983) afirman que cualquier modulador que incremente la relación de formas de la enzima desprotonadas a protonadas puede ser de los más efectivos en conservar el equilibrio alrededor de la forma tetramérica. La temperatura puede influir en la agregación de las subunidades (Hand y Somero, 1983, 1984) así como la concentración de la enzima (Bosca y col., 1985).

En relación con sus propiedades catalíticas, la PFK, como todas las quinasas transfiere grupos fosfato, siendo mayor la especificidad con el sustrato aceptor (F6P) que con el donante (ATP). A pesar de la gran especificidad por la F6P, la PFK tiene capacidad para fosforilar otros azúcares (Bloxhan y Lardy, 1973), y puede usar una gran variedad de nucleótidos trifosfato y donantes fosforilados en su reacción catalítica. Todas las reacciones de transferencia que afectan al ATP requieren un complejo de ATP-ión covalente, que normalmente es el verdadero sustrato. El ión más efectivo suele ser el catión  $Mg^{+2}$ .

Es característico de esta enzima la inhibición por ATP, la cual fue descubierta por Lardy y Parks (1956) en músculo de conejo siendo después observada en la mayoría de las fosfofructoquinasas (Bloxhan y Lardy, 1973; Uyeda, 1979; Sols y col., 1981). Sin embargo, la sensibilidad de la enzima difiere según el origen de la misma. La PFK de hígado de mamíferos (L o B) es más sensible a la inhibición por ATP que la de músculo (M o A) y cerebro (P o C), siendo esta última casi insensible (Vora y col., 1985a y b). Además, en fosfofructoquinasas de algunos microorganismos no se ha observado inhibición (Ferdinandus y Clark, 1969; Doelle, 1972) y tampoco en eritrocitos de trucha (Gaitan y col., 1989). El efecto inhibitor del ATP parece ser debido en su mayor parte al

ATP<sup>4-</sup> libre, ya que en la mayoría de los organismos estudiados, el MgATP<sup>2-</sup>, que a su vez puede ejercer inhibición, es el verdadero sustrato de la PFK (Bloxhan y Lardy, 1973; Uyeda, 1979; Sols y col., 1981; Sand, 1981a; Cronin y col., 1987). El ATP<sup>4-</sup> en algunos organismos es un inhibidor más potente que el complejo MgATP<sup>2-</sup> (Paetkov y Lardy, 1967; Otto y col., 1974), lo que se ha comprobado en peces (Fideu y col., 1985a; Jensen, 1981; Leaver y Burt, 1981) mientras en levaduras (Mavis y Stellwagen, 1970) y en músculo de rata (Reinhart y Lardy, 1980 a) es al contrario. Se ha descrito que el Mg<sup>2+</sup> libre elimina el efecto inhibitor del ATP<sup>4-</sup> y/o MgATP<sup>2-</sup> (Bloxhan y Lardy, 1973; Uyeda, 1979; Turner y Turner, 1980; Fideu y col., 1985b).

La inhibición producida por el ATP es claramente dependiente del pH (Bloxhan y Lardy, 1973; Uyeda, 1979). En PFK de músculo de conejo hay menor inhibición a pH alrededor de 7,1; débil entre 7,5 y 8,5 y a partir de 8,5 no hay inhibición (Jenser y Gesser, 1980, Nicholls y col., 1976). Sin embargo, este efecto es el opuesto en microorganismos y levaduras (Bongly y col., 1968; Isaac y Rhodes, 1986 a y b). En hígado de lubina no se ha observado variación (Fideu, 1986).

También es característico de la PFK, el efecto cooperativo que la F6P produce sobre la cinética a concentraciones inhibitoras de ATP (Atkinson y col., 1965; Bloxhan y Lardy, 1973; Uyeda, 1979). La cinética sigmoideal se transforma en hiperbólica a concentraciones no inhibitoras de ATP, lo que parece indicar una interdependencia entre ambos sustratos cuando el ATP se une a su sitio regulador. Esta unión cooperativa de la F6P, también se ve afectada por el pH, de manera que un aumento del mismo produce una disminución de la cooperatividad y un incremento de la afinidad de la

enzima por la F6P (Bloxhan y Lardy, 1973; Uyeda, 1979; Jensen y Gesser, 1980).

Como ya se ha mencionado anteriormente, el grado de polimerización de la enzima puede ser dependiente de su concentración (Hofer y Kristek, 1975) y el comportamiento de la PFK varía respecto a sus sustratos y efectores cuando se estudia a concentraciones fisiológicas de enzima o con ella diluida (como es usual en los estudios "in vitro") (Bosca y col., 1985). A altas concentraciones de enzima no se produce, o bien disminuye la inhibición por  $ATP^{4-}$  (Bosca y col., 1985; Leaver y Burt, 1981) y aumenta la afinidad por la F6P (Uyeda, 1979, Boxhan y Lardy 1973).

Algunas enzimas de distintos orígenes presentan curvas de saturación bifásica para uno o ambos sustratos, entre ellas la PFK de eritrocitos humanos (Lee y col., 1973), semilla de guisante (Kelly y Turner, 1971), hígado de lubina (Fideu y col., 1985b), *Streptomyces violaceoruber* (Sabater y De la Fuente, 1974) y eritrocitos de trucha (Gaitan y col., 1983).

Para explicar este hecho se han propuesto varias teorías:

- 1.- La existencia de una transición de cooperatividad negativa a bajas concentraciones del sustrato a cooperatividad positiva a altas concentraciones, con una zona intermedia en la que la enzima es relativamente insensible a las variaciones de la concentración del sustrato (Sabater y De la Fuente, 1974). Según Teipel y Koshland (1969) para que se presente este tipo de cinética debe haber más de dos sitios de unión y la unión del ligando (S) a uno de los dos sitios produciría un cambio conformacional en éste que podría afectar a la relativa estabilidad de la conformación de otros sitios.

Por factores intrínsecos, la constante de unión de estos sitios debe primero descender (cooperatividad negativa) y luego incrementarse (cooperatividad positiva). De esta forma se puede explicar este cambio de cooperatividad para un mismo sustrato.

2.- Pueden existir dos sitios independientes con diferente afinidad por el sustrato y al combinarse sitios de alta con baja afinidad darían estos tipos de curvas (Lee y col., 1973). En PFK de corazón de mamíferos se ha propuesto un sitio de alta y otro de baja afinidad para la F6P (Uyeda, 1979).

3.- Existencia conjunta de diferentes estados poliméricos de la enzima cuya asociación-disociación se influye por la concentración de sustrato y por la presencia de efectores (Lee y col., 1973).

4.- Existencia de distintas formas isoenzimáticas con distinta afinidad para unirse al sustrato, como se ha descrito en eritrocitos humanos (Lee y col., 1973), en hígado de lubina (Fideu y col., 1989) y en tejido hematopóyetico de trucha (Gaitan y col., 1990b).

Esta cinética bifásica puede ser modificada por pH, temperatura y algunos efectores, bien variando el intervalo de concentración de sustrato en que se produce la transición o bien eliminando la meseta (Lee y col., 1973; Fideu y col., 1985b).

Una de las propiedades más interesantes de la PFK es la modulación de su actividad por gran variedad de efectores.

Entre los inhibidores más característicos de la PFK de mamíferos podemos citar al citrato, el efecto inhibitor de este compuesto suele ser mayor a altas concentraciones de ATP (Bloxhan y Lardy, 1973; Uyeda, 1979) aunque en corazón de rata se ha observado que el

efecto es independiente (Pogson y Randall, 1976). Además la sensibilidad de la enzima a este compuesto puede variar de unos tejidos a otros dentro de la misma especie (Colombo y col., 1975; Kemp y Foe, 1983). Otros inhibidores fosfato de creatina, 3-fosfoglicerato, 2,3-difosfoglicerato y fosfoenolpiruvato muestran también efecto más pronunciado a altas concentraciones de ATP (Bloxhan y Lardy, 1973; Uyeda, 1979). Todos estos inhibidores potencian la inhibición por ATP y disminuyen la afinidad de la enzima por la F6P. Por el contrario, el PEP ha sido descrito como activador en hígado de lubina (Fideu y col., 1989).

Dentro de los efectores positivos se encuentran  $\text{NH}_4^+$ , c-AMP, AMP, ADP, Pi, F-1,6- $\text{P}_2$ , G-1,6- $\text{P}_2$ , F-2,6- $\text{P}_2$ , R-1,5- $\text{P}_2$  y fosfogluconato (Uyeda, 1979; Bloxhan y Lardy, 1973; Brooks y Storey, 1990; Ishikawa y col, 1989; Van Schaftingen y col, 1982). Estos moduladores contrarrestan la inhibición provocada por citrato y/o ATP y aumentan la afinidad de la enzima por F6P. La acción de todos estos efectores puede estar influida por pH, temperatura, concentración de la enzima y fosforilación de la misma.

Como se indica en el apartado I.4 el comportamiento cinético de las enzimas de los organismos ectotermos pueden modificarse por la temperatura y este efecto es patente en la PFK de peces. Freed (1971), en musculo de carpa, observa que a temperaturas elevadas (25°C) el ión  $\text{Mg}^{2+}$  produce un efecto inhibitor, disminuye la inhibición por citrato y disminuye la afinidad respecto ATP. En lubina se ha observado termorregulación en PFK de hígado (Fideu y col., 1985 a), donde disminuye el coeficiente de Hill y aumenta la afinidad a medida que aumenta la temperatura dentro del intervalo normal del habitat.

Un aspecto importante en la regulación metabólica de una vía es la existencia de formas isoenzimáticas de aquellas enzimas que componen la ruta. Poseen diferentes características cinéticas y reguladoras, lo que hace que su presencia en distintos tipos celulares o tejidos les dé una especificidad metabólica relacionada con la función fisiológica que desempeñan (Guderley y Cardenas, 1980b). La mayoría de los datos se refieren a mamíferos donde la PFK se encuentra en forma de tetrámeros, constituidos por subunidades de tipo M (músculo), tipo L (hígado) y tipo P (plaquetas y cerebro) (Tasai y col., 1975; Vora, 1982 y 1983, Vora y col., 1985 a). Estas subunidades sufren tetramerización y se producen homo o heterotetrámeros, que pueden diferenciarse unos de otros por sus características fisico-químicas y cinéticas (Tasai y col., 1975; Vora, 1982 y 1983; Vora y col., 1985a).

La subunidad M predomina en los tejidos cuya vía principal es la glicolisis, la L en aquellos en que predomina la gluconeogénesis y la P en cultivos celulares con elevada velocidad de replicación y glicolisis aerobia (Vora, 1982). Los homotetrámeros poseen distintas propiedades alostéricas, diferente cooperatividad respecto a F6P y grado variable de inhibición por ATP (en el sentido  $M > L > P$ ). Las más sensibles al citrato son P y M y el efecto de la  $\beta$ -2,6-P<sub>2</sub> es mayor en P y L.

La presencia de estas formas isoenzimáticas características suponen un avance evolutivo debido a la especialización de su función en los distintos tejidos y organismos.

## I.6.- OBJETO DEL TRABAJO.

El objeto del presente trabajo consiste en aportar una serie de datos experimentales encaminados a caracterizar la piruvatoquinasa y la fosfofructoquinasa de músculo de lubina, por ser enzimas claves de la vía glicolítica así como por su interrelación con el control metabólico de la misma.

El enfoque de dicho estudio se basa, en general, en los reducidos estudios bioquímicos realizados hasta el momento utilizando como material biológico la lubina y, en particular, a la inexistencia en la bibliografía consultada de datos concernientes al comportamiento tanto aislado como integrado de estas enzimas en el órgano antes mencionado. Estos estudios, desde el punto de vista de investigación básica y aplicada, creemos que pueden constituir un aporte al conocimiento de la bioquímica de la lubina, así como un punto de apoyo para el cultivo controlado de esta especie.

De esta manera, se ha abordado el estudio de las propiedades enzimáticas y aspectos moduladores en relación con la variación de la temperatura del hábitat de la lubina, así como del pH y se ha investigado la posible presencia de isoenzimas, en relación con los mecanismos de regulación metabólica.



MATERIAL Y MÉTODOS.

## II. MATERIAL Y MÉTODOS.

### II.1.- MATERIAL.

#### II.1.1. MATERIAL BIOLÓGICO.

Se han utilizado lubinas (*Dicentrarchus labrax* L) de siete a doce meses de edad y con un peso de  $38,12 \pm 13,46$  g, procedentes de las salinas "Cultivos piscícolas marinos S.A." y "Esperanza siglo XIX" de San Fernando (Cádiz), donde los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas de oxigenación y salinidad y fueron alimentadas "ad libitum".

Normalmente las lubinas fueron sacrificadas en el lugar de origen, diseccionadas y congeladas en nitrógeno líquido en el menor tiempo posible (aproximadamente 15 minutos). Se liofilizaron y se transportaron hasta el laboratorio en las mismas condiciones de congelación. En algunas ocasiones se utilizaron tanques herméticos con sistema de oxigenación artificial para transportarlas vivas hasta el laboratorio, donde se siguió el mismo proceso anteriormente citado. Las muestras se conservaron congeladas a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de su utilización. El músculo utilizado correspondía a la zona comprendida entre las aletas ventrales y la caudal.

#### II.1.2. PRODUCTOS UTILIZADOS.

Los soportes cromatográficos fueron suministrados por Pharmacia (Sephacryl S-300, Blue Sepharose CL 6B y Superose 12), al igual que los kit de proteínas patrones para las determinaciones del peso molecular de las enzimas.

Los sustratos de las reacciones enzimáticas, los efectores de las mismas, las enzimas auxiliares y los productos usados en la determinación de metabolitos procedían de Boehringer Manheim, excepto la F-2,6-P<sub>2</sub> que era de Sigma Chemical Company.

La poliacrilamida y el resto de reactivos para la preparación de los geles de electroforesis procedían de los laboratorios Bio-Rad.

Todos los demás productos químicos utilizados fueron suministrados por la firma Merck, excepto la glicina que procedía de Fluka.

#### II.1.3. APARATOS UTILIZADOS.

Las pesadas se realizaron en una balanza Sartorius Handy (precisión 0,1 mg) y en un granatario Metzler (precisión 10 mg). Para las mediciones de pH se utilizó un pH-metro Methron-654 de tres cifras decimales con corrección incorporada para la temperatura.

Las disoluciones se prepararon de forma rutinaria con agua bidestilada procedente de un destilador Milli-Ro de la firma Millipore y con agitadores Bunsen MC-B. Para la conservación de los reactivos y de los músculos, una vez extraídos de las lubinas, se utilizó un refrigerador de la marca Aspes modelo ciclomatic de dos motores.

Los homogeneizados se obtuvieron en un homogeneizador eléctrico Ommi-mixer y se centrifugaron en una centrífuga refrigerada Beckman modelo J-21.

Las medidas espectrofotométricas se realizaron en un espectrofotómetro Pye-Unican SP8-100 de Philips, con

registrador incorporado y termostatzado mediante conexi3n del recept3culo de cubetas a un ba1o Braun, Frigomix 1495. Para las incubaciones se utiliz3 un ba1o P-selecta peristern termostatzado.

Las cromatograf3as estandar se llevaron a cabo en columnas, utilizando un colector de fracciones autom3tico Frac 100, al que se acopl3 un detector de prote3nas UV-H conectado a un registrador REC 101, todo ello de la firma Pharmacia LKB. El flujo se mantuvo constante mediante una bomba Eyela MP-3. Todas las operaciones de extracci3n y tratamiento de enzimas se realizaron en una camara fr3a LKB modelo 2021 Maxicolab, a una temperatura de 0° a 4° C.

Las cromatograf3as realizadas en FPLC se llevaron a cabo en un sistema FPLC de la firma Pharmacia, compuesto de dos bombas P 500, un monitor UV-1, una v3lvula V-7, un colector Frac 100, un registrador de tres v3as y un controlador LCC-500.

Las electroforesis de prote3na nativa se realizaron con un sistema Pleuger, con fuente de alimentaci3n de la misma marca, manteniendo constante el amperaje (2-3 mA por tubo). Las electroforesis en condiciones desnaturalizantes se llevaron a cabo en una cubeta V 15-17 BRL, con una fuente de alimentaci3n PS 5000 (IZASA) y se us3 un formador de gradientes de Pharmacia-LKB. En otras ocasiones se us3 tambi3n un equipo Phast system de electofcresis (Pharmacia-LKB).

Los datos se procesaron en un ordenador AMSTRAD PCW 8256 y en un IBM personal system/2 modelo 30.

## II.2.- MÉTODOS.

### II.2.1. DETERMINACIÓN DE METABOLITOS

#### A.-Preparación de las muestras y obtención de extractos.

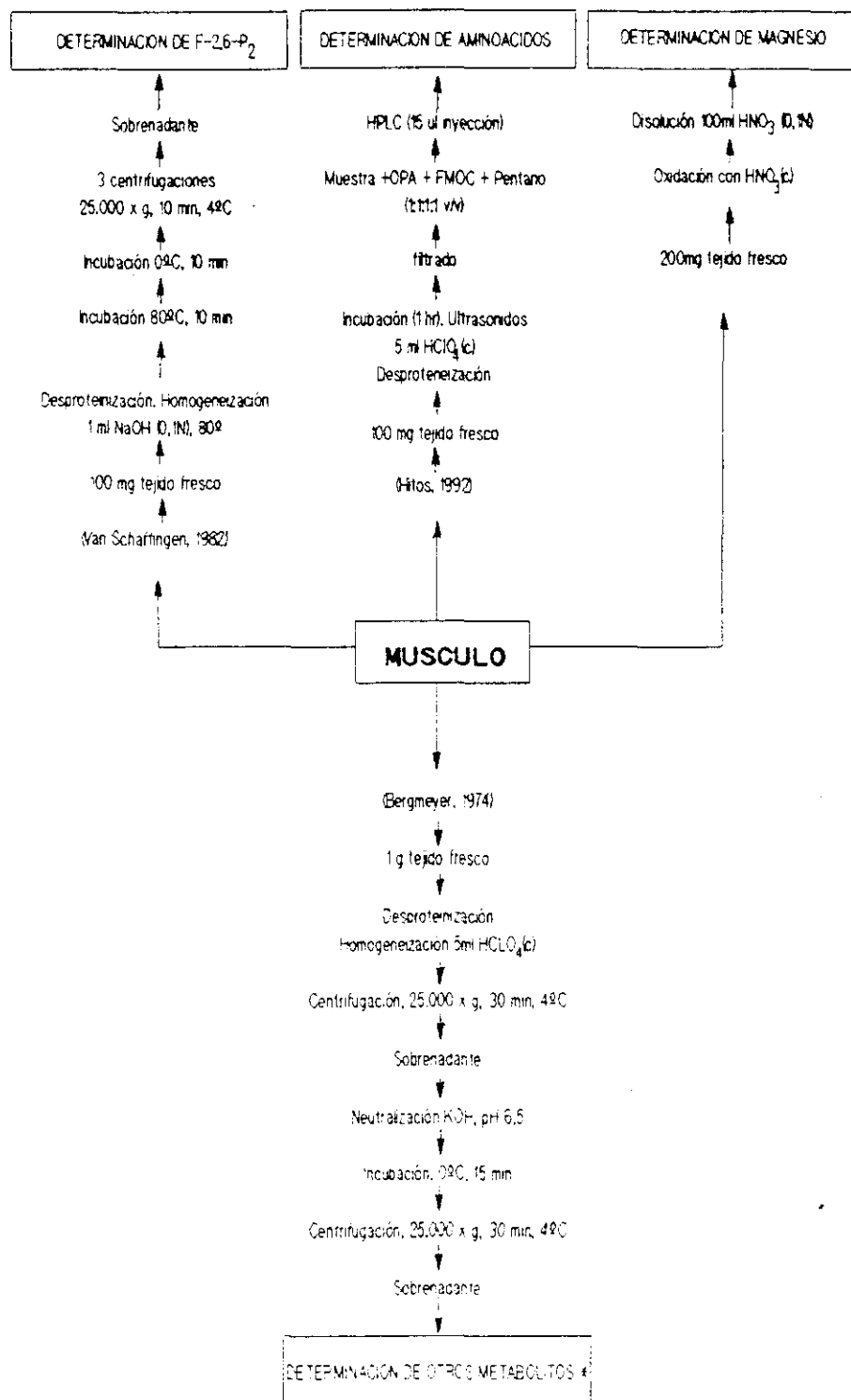
Se llevó a cabo según se refleja en el esquema 5, utilizando los extractos obtenidos en cada caso, para la determinación de la concentración.

En todas las determinaciones se realizaron experimentos con un blanco en el que se sustituye la muestra por agua destilada. Con el fin de asegurar la precisión del método, se realizó otro experimento control con una cantidad conocida del metabolito que se esté determinando.

#### B.- Determinación de la concentración.

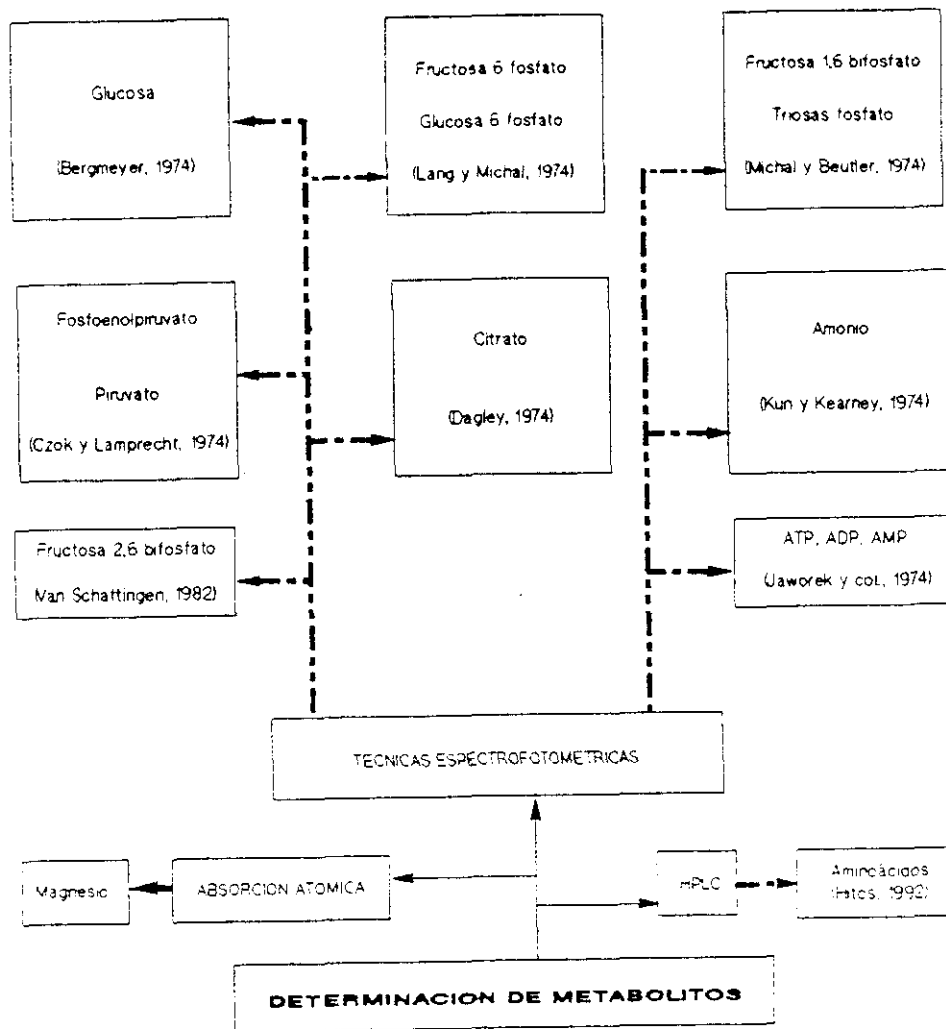
La concentración de los intermediarios glicolíticos, los nucleótidos de adenina y diversos efectores descritos para la piruvatoquinasa y la fosfofructoquinasa, se determinaron mediante técnicas espectrofotométricas, usando sistemas de reacciones enzimáticas acopladas, según los procedimientos descritos por Bergmeyer (1974). En el caso de la F-2,6-P<sub>2</sub> se usó el método de Van Schaftingen y col (1982) (Esquema 6).

La concentración de magnesio se determinó mediante absorción atómica y los aminoácidos por cromatografía líquida de alta presión (HPLC) mediante la formación de OPA (O-phtaldeído) y FMOC (fluoro-fenil-metil-cloroformato) (Esquema 6).



Esquema 5: Preparación de muestras y obtención de extractos para la determinación de metabolitos

\* Este método se utilizó para la determinación de glucosa, F6P, G6P, F-1,6-P<sub>2</sub>, triosas fosfato, PEP, piruvato, ATP, ADP, AMP, fosfocreatina, citrato y amonio.



Esquema 6; Métodos utilizados para la determinación de la concentración intracelular de los diferentes metabolitos.

### C.-Cálculo de las concentraciones de metabolitos.

El contenido de un metabolito en una muestra de tejido lo expresamos en  $\mu\text{mol}/\text{gramo}$  de tejido húmedo, para lo cual hay que utilizar las transformaciones adecuadas, teniendo en cuenta la dilución y el porcentaje de humedad del tejido.

En los casos en que se usaron técnicas espectrofotométricas, la concentración de los diferentes metabolitos en extractos desproteinizados viene dada por la siguiente expresión (Bergmeyer, 1974):

$$c \text{ (}\mu\text{mol/ml)} = \frac{E \times V}{\epsilon \times d \times v \times n}$$

- .  $\Delta E$ = variación de la absorbancia corregido con el blanco.
- .  $V$ = volumen final en ml.
- .  $\epsilon$ = coeficiente de extinción molar. En todas las determinaciones la variación de la absorbancia se produce por un aumento o disminución de NADH o NADPH a 340 nm, habiéndose usado un valor para el coeficiente de  $6,22 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$ .
- .  $v$ = volumen de extracto empleado en la determinación expresado en ml.
- .  $n$ = moles de NADH o NADPH formados o consumidos por cada mol de metabolito transformado. En todas las determinaciones este valor es 1 excepto en la F-1,6-P<sub>2</sub> que es de 2.
- .  $d$ = paso optico de la cubeta (1 cm).

La F-2,6-P<sub>2</sub> se determinó por interpolación en una curva patrón, obtenida a partir de la activación producida, en la PPI-PFK de patata, por unas concentraciones conocidas de F-2,6-P<sub>2</sub> entre 0-1,5  $\mu\text{mol/ml}$ .

La concentración de los aminoácidos, determinada por HPLC, la obtuvimos inicialmente en  $\text{mg}/100 \text{ ml}$  de extracto mediante el uso de un factor de calibrado de acuerdo con la fórmula:

$$\frac{\text{Área de la muestra} \times \text{mg patrón}}{\text{Área patrón}} = \text{mg aminoácidos}/100 \text{ ml}$$

#### I.2.2. PREPARACIÓN DE EXTRACTOS ENZIMATICOS.

Se homogeniza una muestra de músculo, en presencia de tampón Tris maleico 100 mM pH 7,4 (piruva-

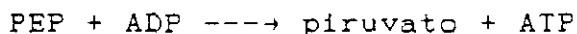


toquinasa) o de tampón fosfato 50 mM pH 8 (fosfofructoquinasa), manteniendo la proporción de 1 g de tejido fresco (270 mg de tejido liofilizado) por cada 19 ml de tampón. El homogeneizado así obtenido, se centrifugó durante 30 minutos a 26.000 x g, manteniéndose la temperatura a 4°C. El sobrenadante se utiliza para la determinación de la actividad enzimática.

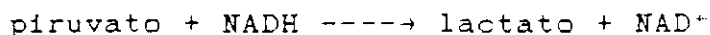
### II.2.3. DETERMINACIÓN DE LAS ACTIVIDADES ENZIMATICAS.

La actividad PK se determinó midiendo espectrofotométricamente a 340 nm la velocidad de oxidación del NADH, utilizando un sistema acoplado de lactato deshidrogenasa (LDH) según las reacciones siguientes (Bergmeyer, 1974):

PK



LDH

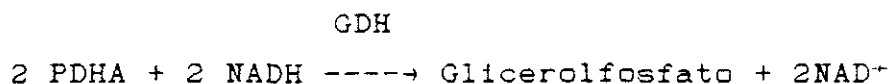
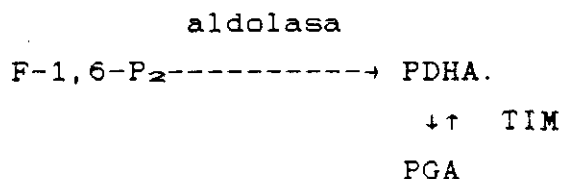
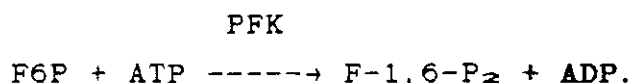


La cantidad de NAD<sup>+</sup> formado por unidad de tiempo, nos permite calcular la actividad de la enzima, ya que el NADH que se oxida se encuentra en relación directa con el PEP que se desfosforila.

La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: Tris maleico pH 7,4 100 mM; PEP 1 mM; MgCl<sub>2</sub> 9 mM; KCl 75 mM; ADP 2 mM; NADH 0,34 mM; LDH 18 UI y 10 µl (conteniendo aproximadamente 25 µg de proteína) de extracto enzimático.

La actividad de la PFK se determinó de acuerdo con el metodo de Layzer (1975), midiendo la velocidad de oxidación del NADH, utilizando un sistema acoplado de aldolasa, triosafosfato isomerasa (TIM) y glicerofofosfa-

to deshidrogenasa (GDH), según el siguiente esquema de reacciones:



La mezcla de reacción contenía, en un volumen final de 1 ml: Tris-HCl pH 8 100 mM; KCl 94,5 mM; DTT 3mM; F6P 1 mM; G6P 3 mM; ATP 3,15 mM;  $\text{MgCl}_2$  3,6 mM; NADH 0.09 mM; aldolasa 0,144 UI; glicerofosfato deshidrogenasa 0,34 UI; triosafosfato isomerasa 0,99 UI y 25  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático (conteniendo aproximadamente 65  $\mu\text{g}$  de proteína).

Para determinar el efecto de la F-1,6-P<sub>2</sub> se empleó un segundo método de medida de actividad enzimática para PFK (Tornhein, 1976), que utiliza un sistema acoplado con lactato deshidrogenasa (LDH) y piruvatoquinasa (PK). La mezcla de reacción contenía en 1 ml de volumen final: Tris-HCl pH 8 100 mM; ATP 3,15 mM; F6P 1mM; G6P 3 mM;  $\text{MgCl}_2$  3.6 mM; KCl 94,5 mM; NADH 0,3375 mM; aldolasa 0,144 UI; PEP 1 mM; PK 5 UI; LDH 6,25 UI y 10  $\mu\text{l}$  de extracto enzimático (conteniendo aproximadamente 25  $\mu\text{g}$  de proteína).

La F-2,6-P<sub>2</sub>, por ser muy sensible a la hidrólisis ácida, se preparó en medio básico (KOH 10 mM).

Los cambios en la absorbancia se miden durante los cinco minutos siguientes al comienzo de la reacción en

los que la variación es lineal con el tiempo. Las cubetas utilizadas en todas las medidas fueron de cuarzo y de 1 cm de paso óptico.

Los experimentos se llevaron a cabo a una temperatura de 22°C, a pH 7,4 para la PK y pH 8,0 en la PFK. En los casos en que estos parámetros se modificaron, se especifica en el lugar correspondiente del texto.

La unidad internacional enzimática (UI) se define como la cantidad de enzima que cataliza la conversión de 1  $\mu\text{mol}$  de  $\text{NAD}^+$  en  $\text{NADH}$  por minuto en condiciones estandar (1 cm de paso óptico, temperatura y pH óptimos). Se ha tomado como coeficiente de extinción molar el valor de  $6,22 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \times \text{cm}^{-1}$  (Horecker y Kornenberg, 1948). La relación de unidades internacionales de enzima por mg de proteína se ha expresado como actividad enzimática específica.

#### II.2.4. DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS.

.-Método Lowry. La determinación de la concentración de proteínas en los extractos crudos se realizó según el método de Lowry y col. (1951)

.-Método espectrofotométrico. En los procesos de purificación se determinó la concentración de proteína mediante espectrofotometría de absorción en la región ultravioleta, según las ecuaciones de Warburg y Christian (1941):.

$$\text{mg/ml de proteína} = 1,55 D_{280} - 0,76 D_{260}$$

.-Método Bradford. La determinación de la concentración de proteínas en los extractos purificados

se realizó según el método de Bradford (1976) con la modificación de Marshall y Williams (1986).

#### II.2.5. DETERMINACIÓN DE LAS PROPIEDADES FÍSICO-QUÍMICAS DE LAS ENZIMAS.

##### A.- Estabilidad enzimática.

Con el fin de determinar la forma de extracción y conservación óptimas de las enzimas, se realizaron experimentos previos para establecer las condiciones que mejor favorezcan la estabilidad de la enzima en relación con la temperatura y el tiempo.

En primer lugar se estudió la influencia de diferentes concentraciones de agentes estabilizantes sobre la actividad enzimática. Los compuestos utilizados fueron: EDTA (0,25; 0,5; 1 y 2 mM), MET (1; 2; 3; 4 y 5 mM), DTT (1; 2; 3; 4 y 5 mM) y glicerol (6; 12; 20 y 30% (v/v)).

Se determinó la estabilidad de la enzima respecto al tiempo a las temperaturas de -20° y 4°C, utilizando las siguientes concentraciones de estabilizantes para la piruvatoquinasa: EDTA 1 mM, MET 5mM, EDTA 1mM + MET 5mM y glicerol 30% (v/v); y para la fosfofructoquinasa: F6P 0,2 mM; ATP 0,2 mM; DTT 5 mM; MET 5 mM; EDTA 1mM y glicerol 20 % (v/v).

##### B.- Influencia del pH.

a) sobre la actividad enzimática. Las condiciones de ensayo fueron las descritas en el apartado II.2.3. El pH del medio se varió con la utilización de varias disoluciones reguladoras (100 mM):

- Tampón glicina, para la zona de pH 11,0 - 9,0.
- Tampón Tris-HCl, para la zona de pH 9,0 - 7,5.
- Tampón Tris maleico, para la zona de pH 7,5 - 5,5.
- Tampón acetato, para la zona de pH 5,5 - 4,5.

b) sobre la estabilidad enzimática. Una vez conocido el pH óptimo de las dos enzimas, se investigó la estabilidad de las mismas a diferentes valores de pH. Los tampones utilizados fueron los señalados en el apartado anterior. Muestras conteniendo el extracto enzimático se incubaron, durante 15 minutos a 22° C, a los diferentes pHs indicados. Se determinó la actividad residual en las condiciones reseñadas en el apartado II.2.3.

#### C.- Influencia de la temperatura.

a) sobre la actividad enzimática. Se utilizaron las condiciones de ensayo ya descritas en el apartado II.2.3. variando la temperatura de la mezcla de reacción.

El cálculo de la energía de activación ( $E_a$ ) se basa en la ecuación de Arrhenius que expresa el efecto de la temperatura sobre las velocidades de las reacciones químicas. La ecuación logarítmica corresponde a:

$$\log K = \log A - (E/2,303RT)$$

Al representar gráficamente  $\log K$  frente a  $1/T$  (representación de Arrhenius) se obtiene una línea recta, cuya pendiente tiene un valor de -0,219 E.

El coeficiente de temperaturas establecido por Vant'Hoff es la relación entre las velocidades de

reacción a  $t + 10^{\circ}\text{C}$  y  $t^{\circ}\text{C}$ . Sus valores límite para las reacciones catalizadas por enzimas son 1,1 y 5,3.

b) sobre la estabilidad enzimática. Los extractos enzimáticos se mantuvieron en presencia de tampón Tris maleico 100 mM, pH 7,4 para la piruvatoquinasa y de tampón fosfato 50 mM, pH 8 para la fosfofructoquinasa, durante 5 minutos a diferentes temperaturas; pasado este tiempo se introducen las muestras en un baño de hielo y se toman alícuotas para determinar la actividad enzimática en las condiciones de ensayo indicadas en el apartado II.2.3.

#### II.2.6. CÁLCULO DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS.

La ecuación de Hill se puede aplicar a enzimas con cinética cooperativa si la velocidad se supone proporcional a la saturación parcial.

$$\log \frac{v}{V-v} = n \log [S] - \log K$$

La representación de  $\log (v/V-v)$  frente a  $\log [S]$  se utiliza frecuentemente para demostrar cinéticas cooperativas de enzimas.

En esta ecuación "n" (nº total de sitios involucrados) sería igual al número de lugares interactuantes en el caso de la existencia de cooperatividad infinita, como describe Bernhard (1968). Sin embargo la pendiente de la representación de Hill se designa por "h" e indica la cooperatividad del sistema midiendo la estequiometría aparente del proceso de unión en el punto de mayor cooperatividad.

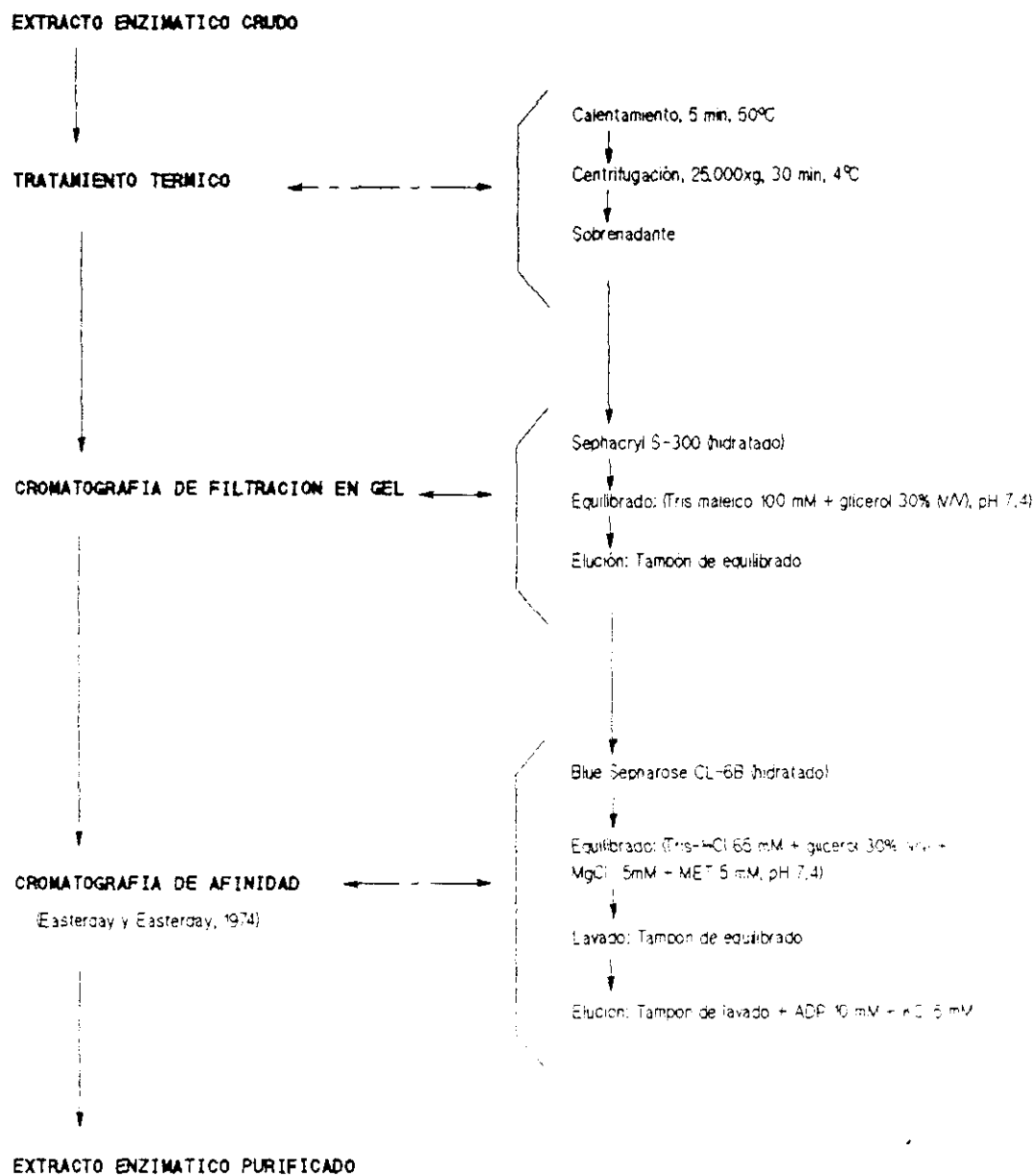
El punto donde la recta corta al eje de abscisas ( $\log (v/V-v) = 0$ ), nos permite determinar la concentración de sustrato a la que se alcanza  $\frac{1}{2} V$  ( $S_{0.5}$ ).

#### II.2.7. PROCESO DE PURIFICACIÓN ENZIMÁTICA.

Los extractos preparados según se describe en el apartado II.2.2. se sometieron a los procesos presentados en los esquemas 7, para la purificación de la piruvatoquinasa, y 8, para la fosfofructoquinasa. Los parámetros operatorios de dichos procesos se encuentran reflejados en la Tabla I.

Tabla I.- Parámetros operatorios utilizados en los procesos de purificación

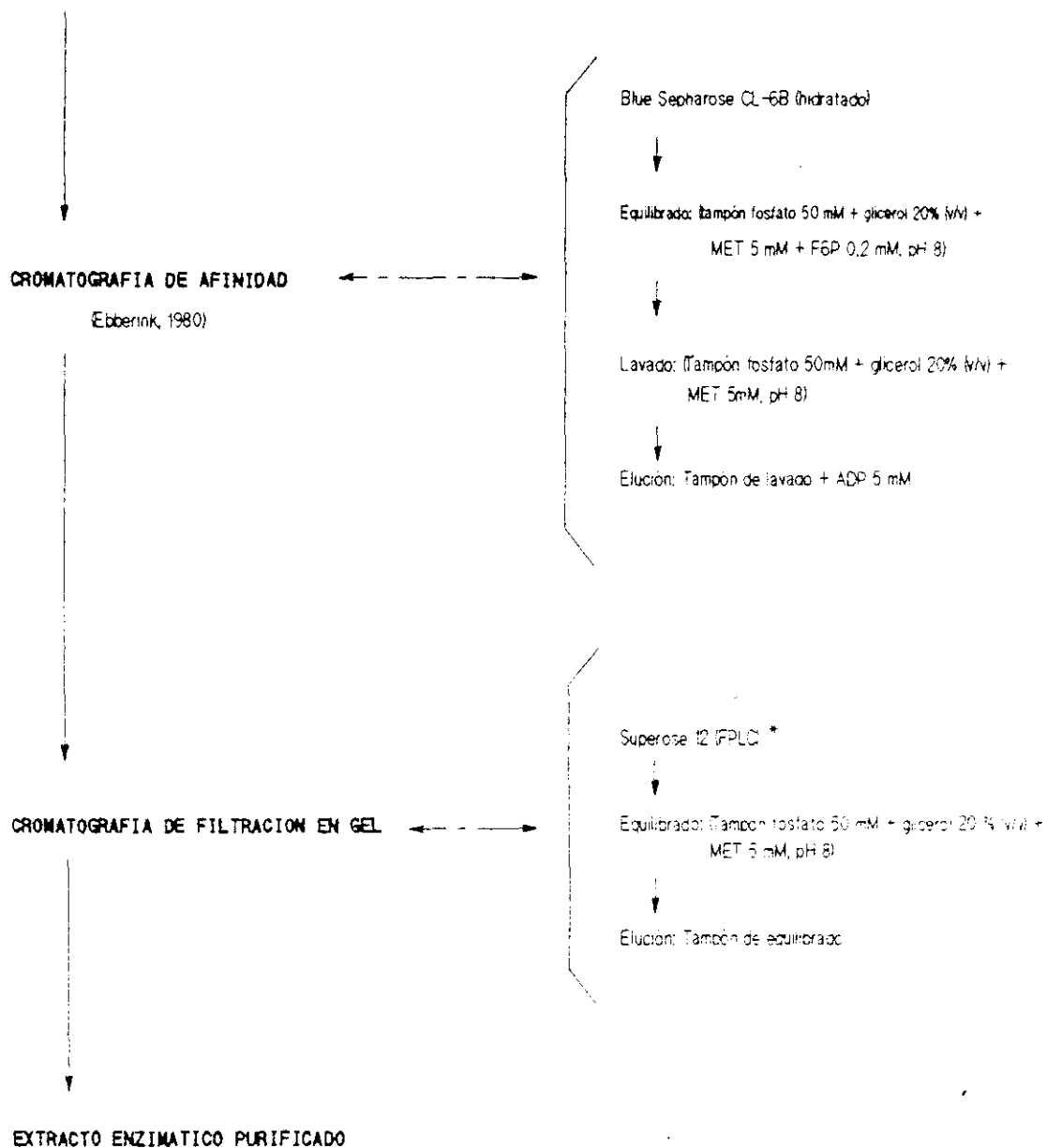
Enzima	Fase estacionaria	Volumen de lecho (ml)	Carga (mg prot/ml gel)	Volumen de flujo (ml/h)
PK	Sephacryl S-300	120	0,3	9
	Blue Sepharose CL-6B	12	3,0 - 5,0	9
PFK	Blue Sepharose CL-6B	18	3,0 - 5,0	10
	Superose 12	25	0,2 - 0,4	10



Esquema 7: Proceso de purificación de la piruvatoquinasa.



EXTRACTO ENZIMATICO CRUDO



Esquema 8.- Proceso de purificación de la fosfofructoquinasa.

\* Equipo de cromatografía en fase líquida para separación rápida de proteínas.

## II.2.8. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

### A.- Condiciones no desnaturalizantes.

Se realizó según el método de Davis (1964). Se prepara el gel de separación al 7,5% de acrilamida y se llenan todos los tubos con el mismo volumen de mezcla. El gel concentrante se prepara al 3 % y una vez polimerizado el gel separador se añade 1 ml del gel de acumulación en cada tubo.

La cantidad de muestra aplicada a cada tubo depende del número de proteínas presentes; si hay pocos componentes (extracto purificado) es de 1 a 20 µg de proteína, mientras que si es crudo se pueden aplicar por encima de 200 µg. A la muestra se le añade glicerol (5% v/v) y azul de bromofenol (0,001%) como referencia de migración.

Las cámaras superior e inferior de la cubeta se llenan de tampón Tris glicina 0,15 M, pH 8,3. La electroforesis se lleva a cabo en cámara fría (4°C) a una intensidad de corriente de 2-3 mA por tubo.

### B.- Condiciones desnaturalizantes.

Las electroforesis en presencia de SDS se han llevado a cabo siguiendo el método de Laemmli (1970) con geles verticales en placas de vidrio.

Para la electroforesis discontinua en gradiente lineal, el gel separador se compone de un gradiente entre el 5 y el 15% de acrilamida con SDS (0,1%) y para la electroforesis discontinua a una concentración fija de acrilamida se usó al 7,5% en presencia de SDS (0,1%).

En ambos casos, se ha utilizado un gel concentrante al 3% de acrilamida con SDS (0,1%). Las cámaras superior e inferior se llenan con la solución tampón Tris glicina 0,19 M, pH 8,3 con SDS (1%).

Las muestras se diluyen al 50% con tampón Tris-HCl 0,12 M pH 6,8 conteniendo SDS (3%), glicerol (10%), MET (15%) y azul de bromofenol (0,0025%) y se hierven durante 2 minutos. Se aplican 5-20 µg de proteína en cada pocillo.

La electroforesis se lleva a cabo manteniendo constante el voltaje (200 V) y la temperatura (10°C).

#### C.- Tinción de los geles.

Se elimina el exceso de SDS de los geles lavando con ácido acético al 7% y después se tiñen durante 6 horas con una disolución de Azul de Coomassie R-250 (0,05%), metanol (25%) y ácido acético (10%). Posteriormente, se lavan con agua destilada y se mantienen en una solución decolorante (ácido acético 10% y metanol 25%) durante al menos 12 horas.

### II.2.9. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR.

#### A.- Mediante electroforesis en gel en condiciones desnaturalizantes.

Para la elaboración de la curva de calibrado, como proteínas marcadoras de peso molecular conocido se han empleado: fosforilasa b (94.0000), seroalbúmina bovina (67.000), ovoalbúmina (43.000), anhidrasa carbónica (30.000), inhibidor de tripsina (20.000) y α lactoalbúmina (14.000).

## **B.- Mediante columna de filtración en gel.**

El peso molecular de la proteína nativa fue determinado en una columna de Sephacryl S-300, preparada según se indica en el apartado II.2.7.

Previo al paso de los patrones de referencia se determinó el volumen de exclusión y total de la columna. Las proteínas patrón utilizadas fueron: Albúmina (67.000); aldolasa (158.000); catalasa (232.000); ferritina (440.000) y tiroglobulina (669.000). Se aplica un volumen de 2 ml utilizando para su dilución el mismo tampón de equilibrado. Los volúmenes de elución de cada una de ellas se obtuvieron espectrofotométricamente a 280 nm.

Una vez eluidas las proteínas patrones y sin modificar las condiciones de la columna se introduce la enzima y se determina su actividad en el eluato.

### **II.2.10 VALORACIÓN DE DATOS.**

El tratamiento estadístico de los valores experimentales obtenidos se ha realizado mediante el cálculo de la media aritmética ( $\bar{X}$ ), la desviación típica ( $\sigma$ ) y el coeficiente de variación (C.V.). Las rectas se han ajustado mediante un programa informático de ajuste de rectas por regresión lineal que utiliza el método de los mínimos cuadrados, calculando en cada ajuste el coeficiente de regresión y desechando aquellos ajustes que presentaban un valor inferior a 0.97.

En aquellos casos en que fue necesaria una comparación se calculó la significancia estadística por la distribución de Student, que es una corrección de la distribución normal de frecuencias para pequeños

muestreos (Segel, 1970). Con el cálculo de la "t" de Student para las distintas probabilidades, evaluamos la mayor o menor probabilidad de que la diferencia de un resultado con otro sea o no estadísticamente significativa.

RESULTADOS.

### III. RESULTADOS: DETERMINACION DE METABOLITOS.

#### III.1 DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE METABOLITOS.

Se han determinado las concentraciones intracelulares de algunos metabolitos relacionados con la ruta glicolítica. Los extractos fueron obtenidos según se describe en el apartado II.2.1.A. y para la determinación de su concentración se siguieron los métodos señalados en el apartado II.2.1.B. Los resultados obtenidos, expresados en  $\mu\text{moles/g}$  de tejido húmedo, se reflejan en las tablas I y II.

A partir de los valores encontrados para los nucleótidos de adenina, determinamos la carga energética celular, aplicando la expresión descrita por Atkinson y Walton (1967):

$$\frac{\frac{1}{2} \text{ ADP} + \text{ATP}}{\text{AMP} + \text{ADP} + \text{ATP}}$$

encontrándose un valor de 0,84.

Se determinó también el cociente F6P/F-1,6-P<sub>2</sub> para comprobar si la reacción catalizada por esta PFK es una etapa limitante en la velocidad glicolítica. El valor obtenido fue de 2,15.

Las concentraciones determinadas se utilizan en experimentos posteriores para intentar aproximar lo más posible los estudios cinéticos "in vitro" a lo que podría suceder "in vivo"

Tabla I.- Concentraciones intracelulares de algunos metabolitos intermediarios de la ruta glicolítica y nucleótidos de adenina en tejido fresco .

Metabolito.	Concentración ( $\mu\text{moles/g} \times 10^2$ )
Glucosa	29,0 $\pm$ 0,6
Glucosa 6 fosfato	52,0 $\pm$ 3,5
Fructosa 6 fosfato	5,8 $\pm$ 1,0
Fructosa 1,6 bifosfato	2,7 $\pm$ 0,3
Triosas fosfato	0,7 $\pm$ 0,1
Fosfoenolpiruvato	5,7 $\pm$ 1,4
Piruvato	5,2 $\pm$ 0,4
ATP	275,0 $\pm$ 33,0
ADP	44,0 $\pm$ 1,0
AMP	12,0 $\pm$ 2,0

Tabla II.- Concentraciones intracelulares de algunos metabolitos descritos como efectores de la piruvatoquinasa y fosfofructoquinasa en tejido fresco.

Metabolito	Concentración ( $\mu\text{moles/g} \times 10^2$ )
Fructosa 2,6 bifosfato *	29,0 $\pm$ 9,0
Fosfato de creatina	371,0 $\pm$ 17,0
Citrato	66,1 $\pm$ 15,9
Amonio	330,0 $\pm$ 56,0
Magnesio	2488,0 $\pm$ 86,4
Fenilalanina	6,6 $\pm$ 0,5
Alanina	25,0 $\pm$ 3,0

\* nm/g  $\times 10^2$



#### **IV. RESULTADOS: PIRUVATOQUINASA.**

##### **IV.1. ESTUDIOS PRELIMINARES DE LA ENZIMA.**

Todos los estudios realizados sobre la enzima reflejados en este apartado se han llevado a cabo en extracto crudo, con el objeto de establecer las condiciones óptimas de mantenimiento, aislamiento y purificación de la enzima y comparar posteriormente los resultados obtenidos con observados con la enzima purificada.

##### **IV.1.1. EXPLORACIÓN DE PIRUVATOQUINASA EN DIVERSOS ORGANOS DE LUBINA.**

Con el fin de conocer cuál es el órgano o tejido de mayor actividad piruvatoquinásica de la lubina, se estimó su actividad específica en músculo, corazón, hígado y riñón, en las condiciones estandar de ensayo, según se describe en el apartado II.2.3.

El tejido en el que se encontró mayor actividad específica fue el músculo (3,8 UI/mg), alcanzando sólo el 12% de este valor la enzima de corazón, la de hígado un 2% y la de riñón un 1,1%.

##### **IV.1.2. PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS DE LA ENZIMA.**

###### **A.- Estabilidad enzimática.**

Los experimentos se realizaron según se indica en el apartado II.2.5.A. Los resultados mostraron una ligera inhibición de la actividad enzimática a concentraciones superiores a 1 mM de EDTA y 5 mM de MET, no viéndose afectada por las distintas concentraciones de glicerol.

Se estudió la estabilidad de la enzima respecto al tiempo y a las temperaturas de 4° y -20°C según se describe en el apartado II.2.5.A. A la temperatura de 4° C, observamos una pérdida de actividad bastante acusada respecto al tiempo en presencia de MET y EDTA a cualquiera de las concentraciones ensayadas, mayor a la observada cuando se mantiene en ausencia de estos compuestos. El glicerol 30% (v/v) por el contrario estabiliza la enzima manteniendo el 60% de actividad a las 120 h frente al 35% que muestra el control.

A la temperatura de -20° C el efecto de EDTA y MET, en las concentraciones señaladas en el apartado II.2.5.A., es menos acusado y se observa en todos los casos y en función del tiempo una ligera disminución de la actividad enzimática respecto al control. El glicerol 30% (v/v) actúa como estabilizante neto para todos los periodos de tiempo ensayados y mantiene el 90% de la actividad después de 168 h.

Por ello en el medio de extracción se utilizó siempre glicerol al 30% (v/v) y los extractos se mantienen congeladas a -20°C hasta el momento de su utilización.

#### **B.-Influencia del pH.**

El efecto del pH sobre la actividad enzimática se muestra en la figura 1A. Se determinaron las actividades a una temperatura de 22°C y a diferentes valores de pH (4,5-11), según el método descrito en el apartado II.2.5.B. Se observa un máximo de actividad (100%) a pH 7,4 con tampón Tris maleico. A este mismo pH, con tampón Tris-HCl se observó tan solo una actividad del 80%. A partir del máximo se contempla una disminución acusada y simétrica en ambas zonas de la curva, ácida y básica.

La influencia que pueden tener las distintas concentraciones de hidrogeniones sobre la estabilidad de la piruvatoquinasa se determinó según se describe en el apartado II.2.5.B. Los resultados obtenidos (figura 1B) indican que la PK, mantenida durante 15 minutos a 22°C, conserva el 100% de actividad en un rango de pH de 7 a 9 y mantiene más del 50% de actividad en el intervalo de pH entre 5 y 10,5.

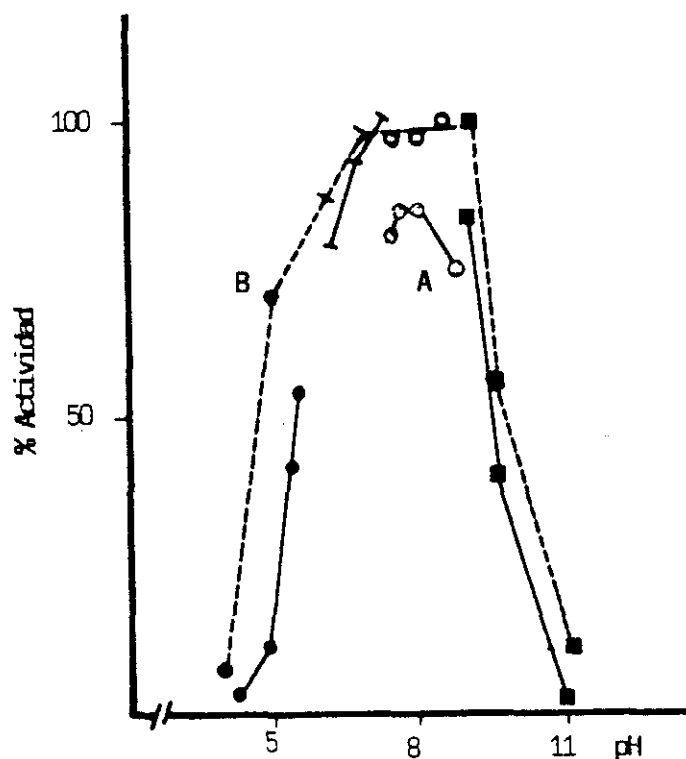


Figura 1.- Influencia del pH (A) sobre la actividad enzimática y (B) sobre la estabilidad enzimática..

- T, Acetato.
- T, Tris-maleico.
- T, Tris-HCl.
- T, Glicina.

#### C.-Influencia de la temperatura.

El efecto de la temperatura sobre la velocidad de la reacción catalizada por la piruvatoquinasa se observa

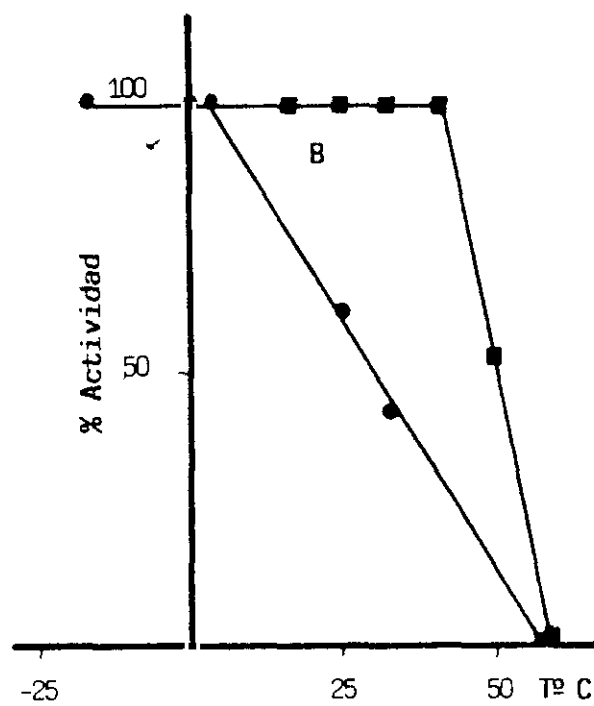
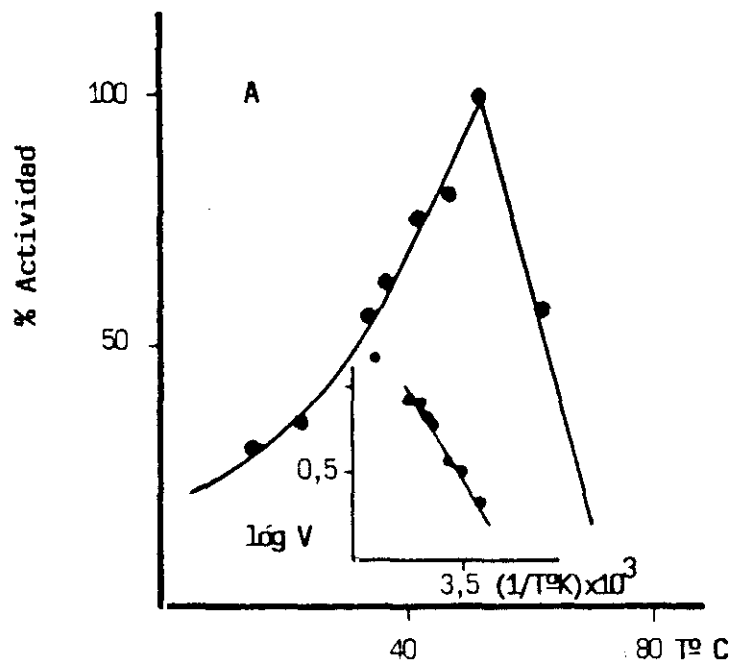


Figura 2.- Influencia de la temperatura (A) sobre la actividad enzimática (Representación de Arrhenius) y (B) sobre la estabilidad enzimática

- Control,
- Glicerol al 30% (v/v),

en la figura 2A. La actividad enzimática aumenta progresivamente hasta adquirir un valor máximo a 50° C, a partir del cual desciende bruscamente para anularse a 70° C. De la representación de Arrhenius se ha obtenido un valor de  $E_a$  de 27 KJ/mol. El valor del coeficiente de temperatura,  $Q_{10}$ , en el intervalo de 5° a 50° C es de  $1,4 \pm 0,1$ .

Los resultados del estudio de la influencia de la temperatura sobre la estabilidad enzimática se observan en la figura 2B. La enzima conserva el 100% de la actividad, a pH 7,4 en tampón Tris maleico, en el intervalo de temperaturas de -20 a 50°C en presencia de glicerol 30% (v/v) y entre -20 a 10°C en ausencia del mismo. En ambos casos a partir del máximo la actividad desciende bruscamente, siendo nula a 60°C.

#### IV.1.3. PROPIEDADES CINÉTICAS DE LA PIRUVATOQUINASA.

##### A.- Influencia de los sustratos.

Con objeto de conocer el comportamiento de la enzima, en extracto crudo, respecto a sus dos sustratos, se determinó la actividad enzimática a distintas concentraciones de los mismos, realizándose los ensayos a pH 7,4 (valor al que se alcanza el máximo de actividad) y 22°C (que se considera la temperatura óptima para la fisiología del animal).

En la figura 3 se muestran las curvas de saturación para ambos sustratos: fosfoenolpiruvato (PEP) y ADP. En los dos casos se observa una cinética de tipo hiperbólico.

Para el sustrato PEP se obtuvo un coeficiente de Hill de  $1,10 \pm 0,05$  y una  $K_m$  de  $0,160 \pm 0,005$  mM. En el

caso del ADP la saturación se produce a concentraciones mayores de sustrato (2 mM); el valor del coeficiente de Hill es de  $1,13 \pm 0,17$  y el de la  $K_m$  de  $0,33 \pm 0,07$  mM.

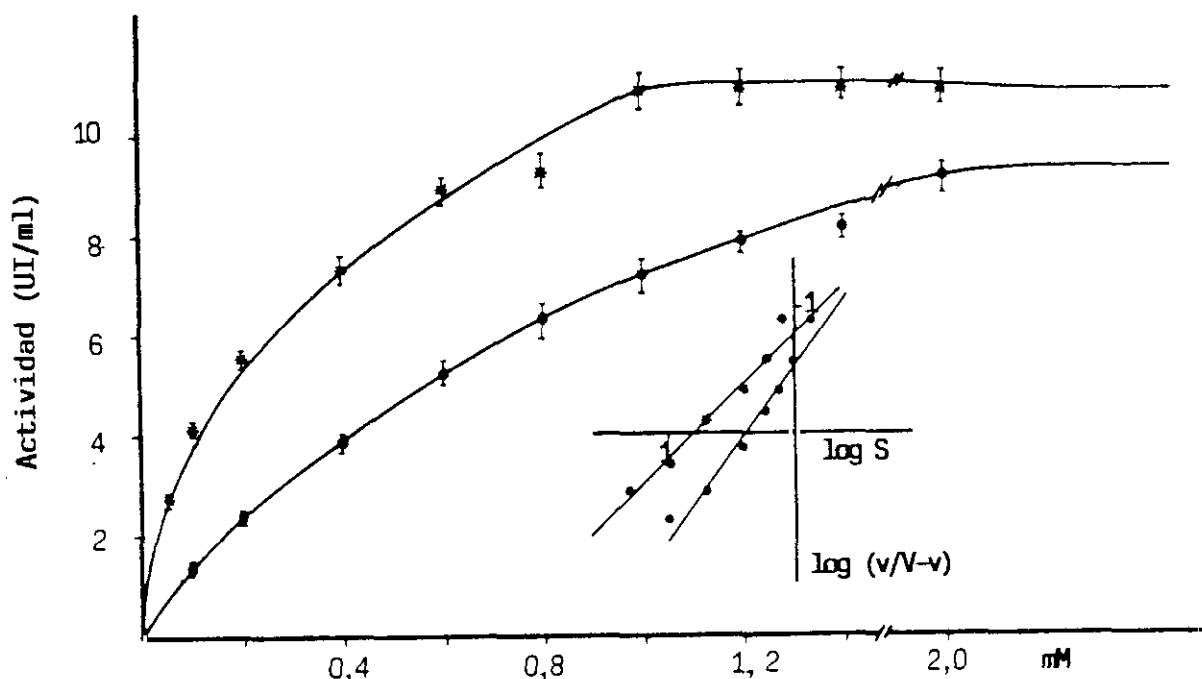


Figura 3.- Influencia de la concentración de sustratos. Representación de Hill inserta.

• ADP  
\* PEP

#### B.- Modulación de la piruvatoquinasa.

a.- Influencia del pH: Con el fin de comprobar si la PK de músculo de lubina está sometida a regulación debido a la variación del pH, se realizaron los mismos experimentos que en el apartado anterior pero a pH 6,8 (más cercano al fisiológico), no observándose ninguna variación en los parámetros cinéticos respecto a ambos sustratos (PEP y ADP).

b.- Influencia de la temperatura: En los organismos ectotermos, las variaciones de temperatura del

hábitat pueden dar lugar a modificaciones en las propiedades cinéticas y reguladoras de las enzimas y en el metabolismo general, como comentamos en el apartado I.4. Debido a esto se estudió el comportamiento de la enzima respecto a sus sustratos a tres temperaturas: 10°C (temperatura mínima del hábitat), 15°C (media) y 22°C (superior), manteniendo el pH a 7,4 que es el de máxima actividad, ya que sus parámetros cinéticos no se veían afectados por el cambio a pH más fisiológico.

No se observó termorregulación aparente para ninguno de los sustratos. Respecto al PEP tan solo se observa un ligero aumento de la cooperatividad a las temperaturas más bajas ( $h = 1,30 \pm 0,03$ ), sin embargo la afinidad de la enzima no se modificó.

c.- Influencia de diferentes efectores. Se probaron sobre ambos sustratos (PEP y ADP) a concentraciones de saturación (1 y 2 mM respectivamente) y en puntos intermedios (0,2 y 0,8 mM) los siguientes efectores : fructosa 1,6 bifosfato (0,01; 0,1 y 1 mM), fenilalanina (1 mM), fosfato de creatina (0,5 y 1 mM), alanina (0,5 a 10 mM), ATP (0,5 a 10 mM), glucosa 1,6 bifosfato (0,01; 0,1 y 1 mM) y fructosa 2,6 bifosfato (0,01; 0,05; 0,1 y 1 mM)

A diferencia de lo encontrado en hígado de esta misma especie (Fideu y col., 1986) y otros tejidos de peces (Gaitan y col., 1983) no se observó efecto con ninguno de los moduladores, en experimentos realizados en extracto crudo con excepción de F-2,6-P<sub>2</sub>. En la figura 4 se observa el comportamiento cinético de la piruvatoquinasa respecto al PEP, en presencia y ausencia de 0,1 mM de F-2,6-P<sub>2</sub> (que es la menor concentración que produce efecto sobre extracto crudo). La F-2,6-P<sub>2</sub> se comporta como un efector positivo con un porcentaje de

activación de  $39\% \pm 10$  en todos los puntos aunque no varían significativamente los parámetros cinéticos con respecto a los del control ( $h = 0,96 \pm 0,11$ ;  $K_m = 0,15 \pm 0,1$ ).

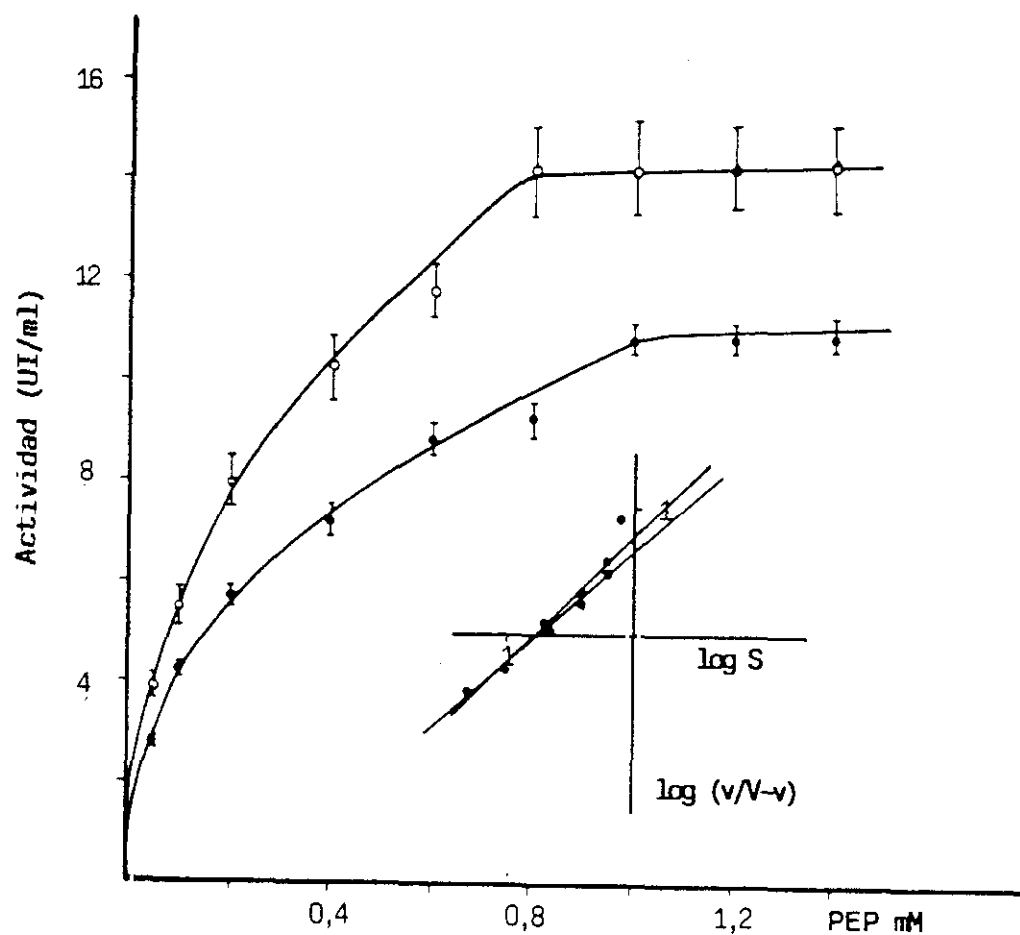


Figura 4.- Efecto de la F-2,6-P<sub>2</sub> en el comportamiento cinético (extracto crudo). Representación de Hill inserta.

- Control (PEP).
- + F-2,6-P<sub>2</sub> (0,1 mM).



## IV.2. PURIFICACIÓN E INVESTIGACIÓN DE FORMAS ENZIMATICAS.

### IV.2.1. TRATAMIENTO TÉRMICO.

Se realizó en las condiciones indicadas en el apartado II.2.7.A. a 50°C de temperatura y en presencia de glicerol 30% (v/v), ya que en estas condiciones no hay prácticamente pérdida de la actividad piruvatoquinasa y sí existe una desnaturalización de otras proteínas presentes en el extracto, obteniéndose una purificación de dos veces con un rendimiento del 97%.

Otros tratamientos previos probados fueron: la precipitación con sulfato amónico (con un rendimiento y un factor de purificación de 98% y 1,5 respectivamente) y precipitación con polietilenglicol (con un rendimiento del 40% y una purificación de solo 1,2 veces). Estos procesos no se utilizaron posteriormente ya que se obtenía una menor purificación y en el caso del PEG además un bajo rendimiento.

### IV.2.2. CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL (SEPHACRYL S-300).

Se utilizaron los parámetros operatorios descritos en el apartado II.2.7. El perfil de elución pone de manifiesto un solo pico de actividad piruvatoquinásica (figura 5A). El grado de purificación y rendimiento del proceso, referidos a la fracción de máxima actividad son de 16 y 50% respectivamente (Tabla III). Si no se realiza el tratamiento térmico el rendimiento mejora (60%) pero el factor de purificación obtenido es solo de 10 veces.

#### IV.2.3. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD (BLUE SEPHAROSE CL-6B)

Se utilizaron los parámetros operatorios señalados en el apartado II.2.7. En el perfil del eluido (figura 5B) se puede observar un solo pico de actividad, que eluye cuando ha pasado aproximadamente un volumen de tampón igual al volumen de lecho. El grado de purificación y el rendimiento de este paso es de 50 y 50% respectivamente. Si no se realiza ningún paso previo el rendimiento es del 90% pero el factor de purificación obtenido es solo de 10 veces.

Tabla III.- Proceso de purificación de la piruvatoquinasa .

Etapas de purificación	Actividad (UI/ml)	Proteínas (mg/ml)	A.E.E. (UI/mg)	Factor de purificación	Rendimiento (%)
Homogeneizado	9,80	2,520	3,8	----	100
Tratamiento térmico	9,46	1,220	7,7	2	97
Sephacryl S-300	1,30	0,022	60,0	16	50
Blue Sepharose CL-6B	1,70	0,009	190,0	50	50

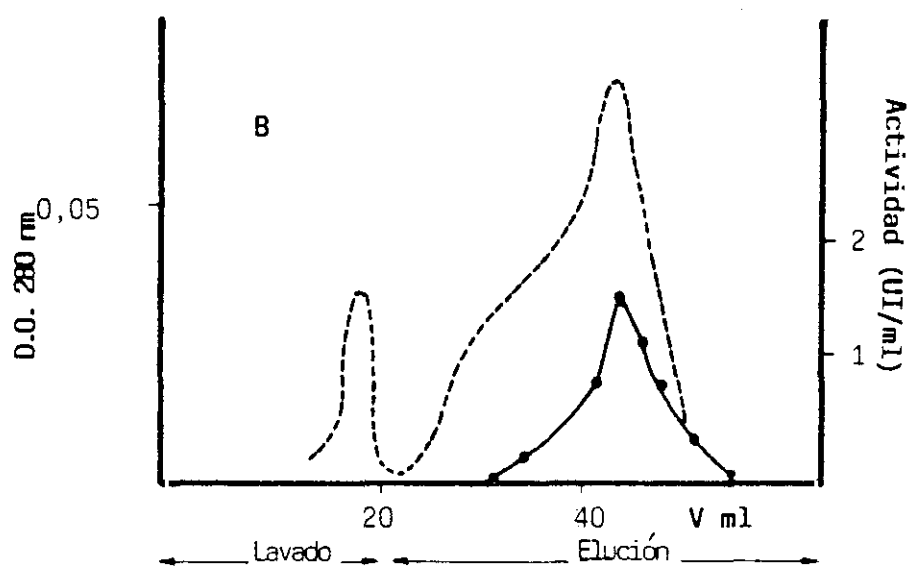
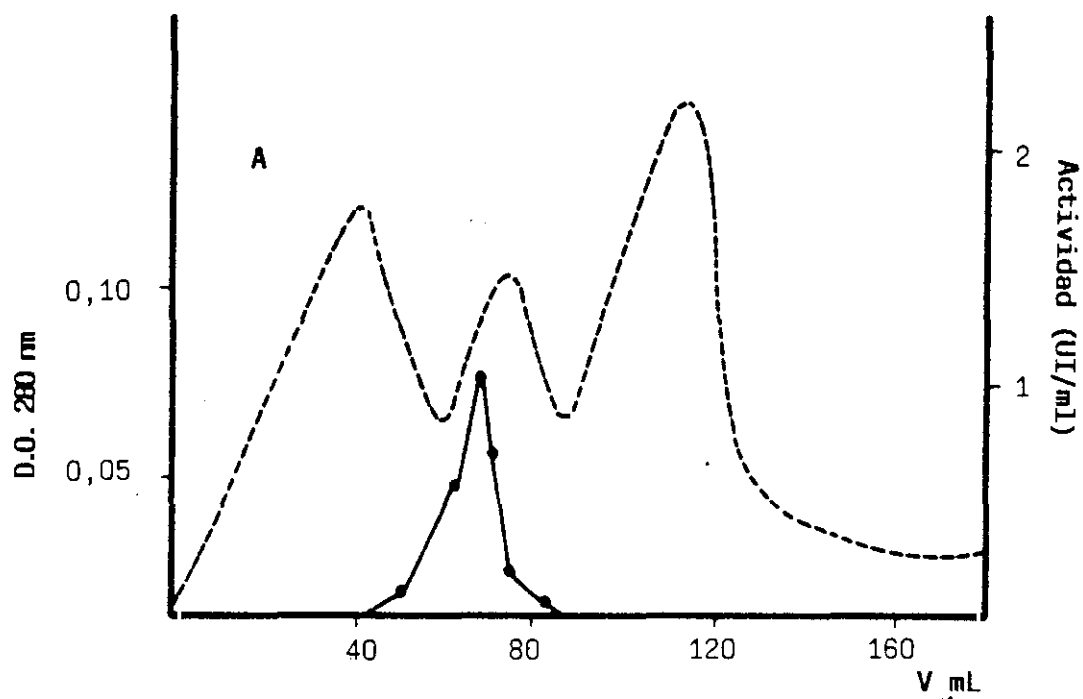


Figura 5.- Perfiles cromatográficos de la purificación de piruvatoquinasa.

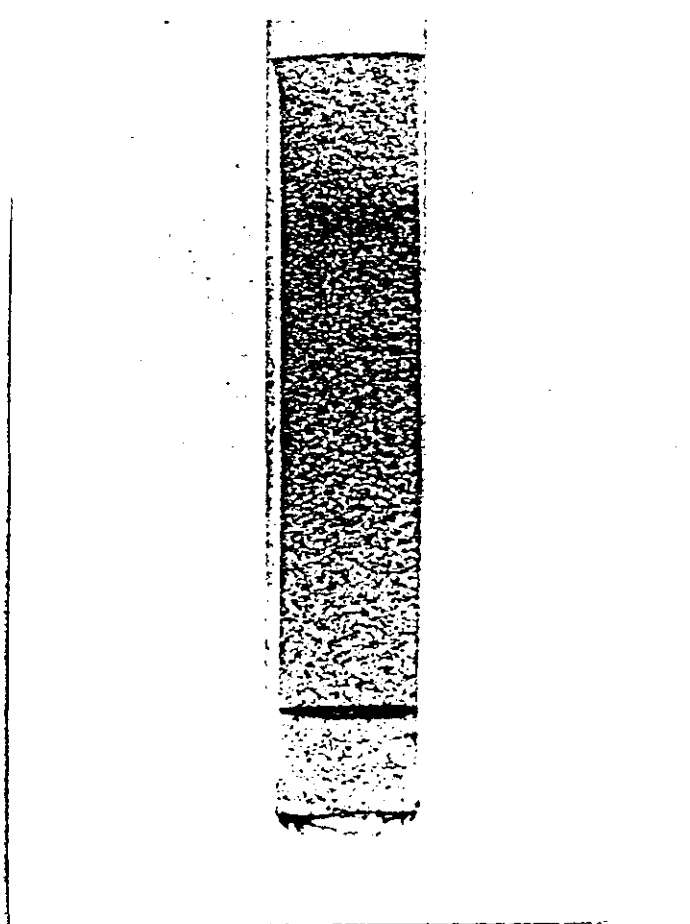
(— actividad enzimática; --- proteína).

A.- Sephacryl S-300.

B.- Blue Sepharose CL-6B.

#### IV.2.4. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

La preparación de los geles de electroforesis y la técnica utilizada se realizó según se describe en el apartado II.2.8.A, utilizando muestras, tanto de extracto crudo, como de extractos procedentes de los diferentes pasos de la purificación. En la figura (fotografía 1) se muestra el desarrollo electroforético del eluido de la cromatografía de afinidad, donde se observa sólo una banda.



Fotografía 1.- Desarrollo electroforético en gel de poliacrilamida de la piruvatoquinasa  
(fracción con actividad obtenida por cromatografía en Blue Sepharose CL-6B).

#### IV.2.5. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR.

La determinación del peso molecular de la piruvatoquinasa de músculo de lubina se llevó a cabo en una columna de Sephacryl S-300 según el método descrito en el apartado II.2.9.B. Al interpolar el volumen de elución de la piruvatoquinasa en la curva patrón, se obtiene un valor para la enzima nativa de  $580.000 \pm 20.000$  daltons. (figura 6).

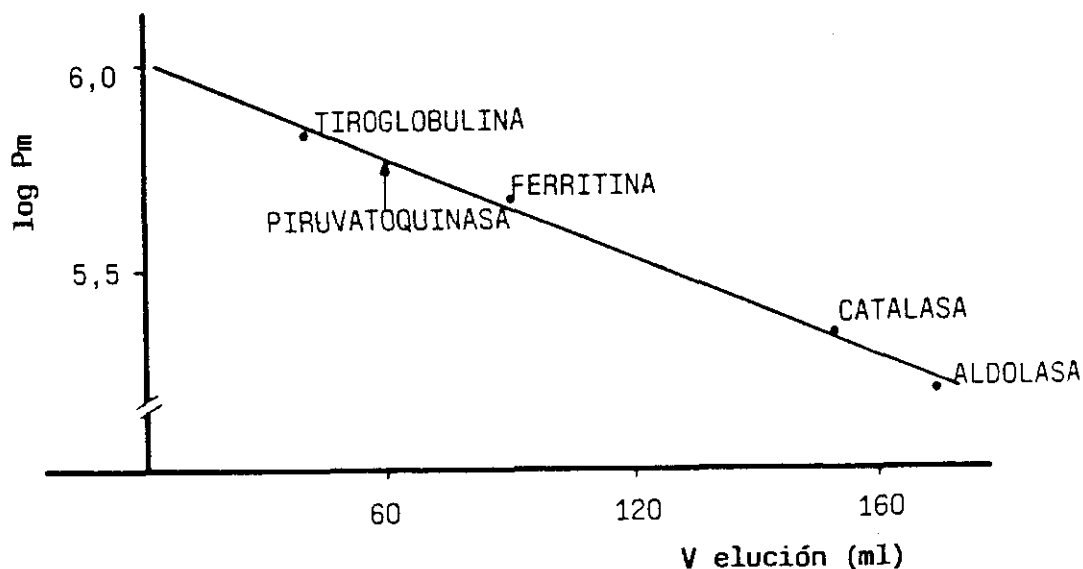


Figura 6.- Curva de calibrado para la determinación del peso molecular de la PK de músculo de lubina en Sephacryl S-300.

Proteínas patrón: Albúmina (67.000), Aldolasa (158.000), Catalasa (232.000), Ferritina (440.000) y Tiroglobulina (669.000).

#### IV.3. ESTUDIO DEL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LA ENZIMA.

Todos los estudios realizados sobre la enzima que se reflejan en este apartado se han llevado a cabo en extracto purificado, con el fin de obtener datos complementarios con los ya obtenidos para la enzima en crudo.

##### IV.3.1. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE SUSTRATO SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PIRUVATOQUINASA.

###### A.- Fosfoenopiruvato.

En la figura 7A se muestra la curva de saturación por PEP ensayada a 22° C y pH 7,4. En la representación directa se observa un comportamiento sigmoideal para este sustrato, con un coeficiente de Hill de  $1,88 \pm 0,18$  y con una  $S_{0,5}$  de  $0,33 \pm 0,06$  mM. Estos resultados indican una cooperatividad positiva en la unión del sustrato PEP, que se confirmó con la representación de Lineweaver-Burk.

###### B.- ADP.

Los resultados que se muestran en la figura 7B evidencian una clara cinética hiperbólica para este sustrato, que se confirma con el hecho de que en la representación de Lineweaver-Burk da una línea recta y el coeficiente de Hill estimado es de aproximadamente la unidad ( $1,1 \pm 0,1$ ). El valor de la  $K_m$  estimado es  $0,31 \pm 0,06$  mM, muy similar al encontrado con extracto crudo.

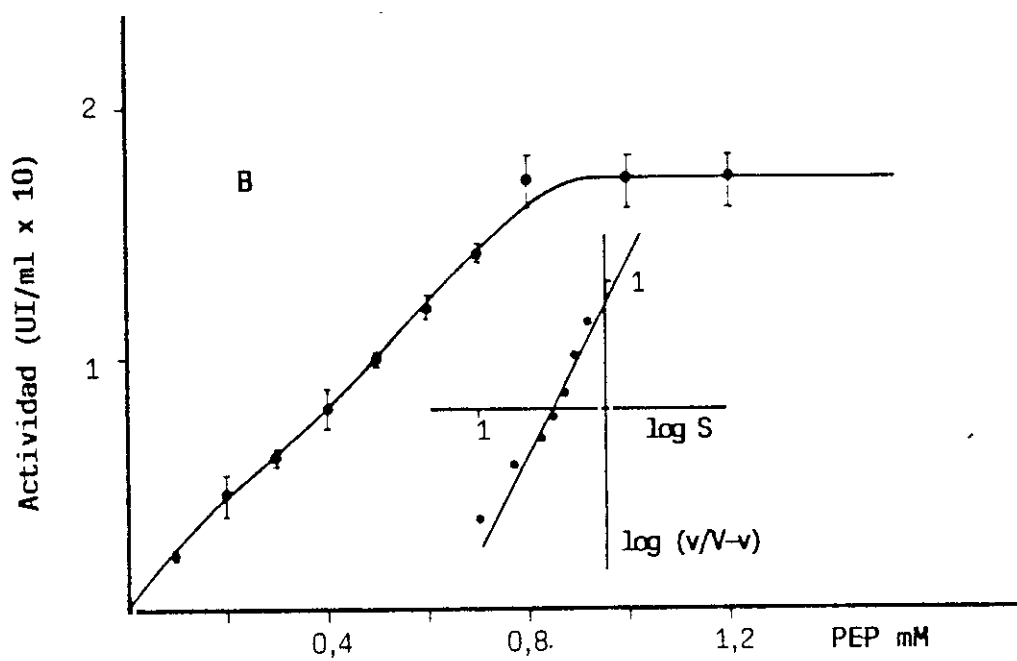
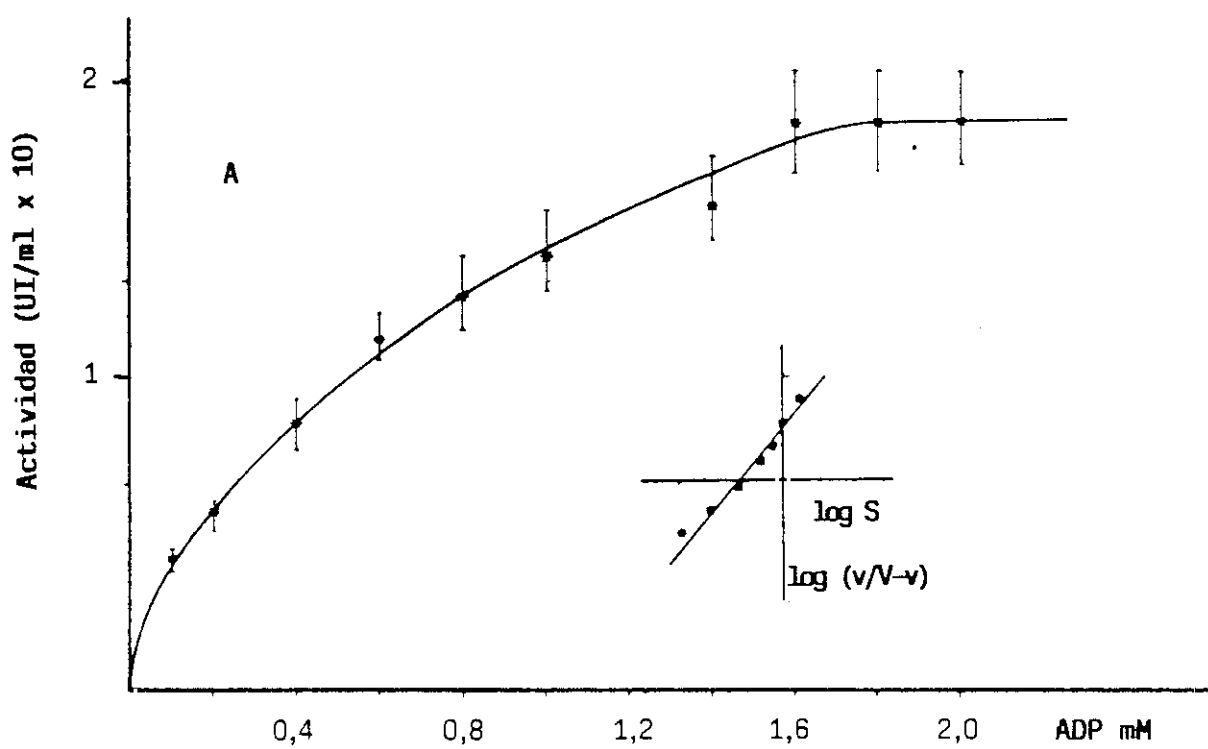


Figura 7.- Influencia de la concentración de sustrato sobre la actividad de piruvatoquinasa purificada. Representación de Hill inserta.

\* ADP,

● PEP,

#### IV.3.2. INFLUENCIA DE LA TEMPERATURA SOBRE EL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LA PIRUVATOQUINASA.

Como ya hemos indicado, la temperatura en esta clase de organismos puede actuar como un regulador de las actividades enzimáticas. Por ello se determinó su posible efecto sobre la piruvatoquinasa respecto a sus dos sustratos. Los experimentos se llevaron a cabo a cinco temperaturas diferentes: 5 y 27°C (como temperaturas extremas del hábitat de la lubina) y 10, 15 y 22°C (como temperaturas baja, media y alta de las normales del hábitat).

En la figura 8 se muestra la variación de los parámetros cinéticos ( $h$  y  $S_{0,5}$ ) respecto al PEP, a las distintas temperaturas ensayadas. En todos los casos se conserva la cinética sigmoideal ya que los valores del coeficiente de Hill se mantienen por encima de la unidad. Se observa que a los valores extremos, existe una menor cooperatividad ( $1,4 \pm 0,2$ ) que en las temperaturas normales del hábitat; y en estas aumenta hasta un máximo ( $2,3 \pm 0,3$ ) correspondiente a 15°C (temperatura media). Los valores correspondientes a 10 y 22°C son  $2,1 \pm 0,19$  y  $1,88 \pm 0,18$  respectivamente.

Se refleja también en la figura 8, que la afinidad varía poco entre 5 y 15°C con un valor de  $S_{0,5}$  aproximadamente de 0,4 mM ( $0,4 \pm 0,03$ ;  $0,34 \pm 0,05$  y  $0,44 \pm 0,09$  mM para 5, 10 y 15°C) y luego aumenta ligeramente al aumentar la temperatura. Los valores correspondientes a 22 y 27°C son  $0,33 \pm 0,06$  y  $0,18 \pm 0,04$  mM respectivamente.

Respecto al ADP, el otro sustrato de la enzima, no se ha observado termorregulación alguna, ni a las temperaturas normales del hábitat ni a las extremas.



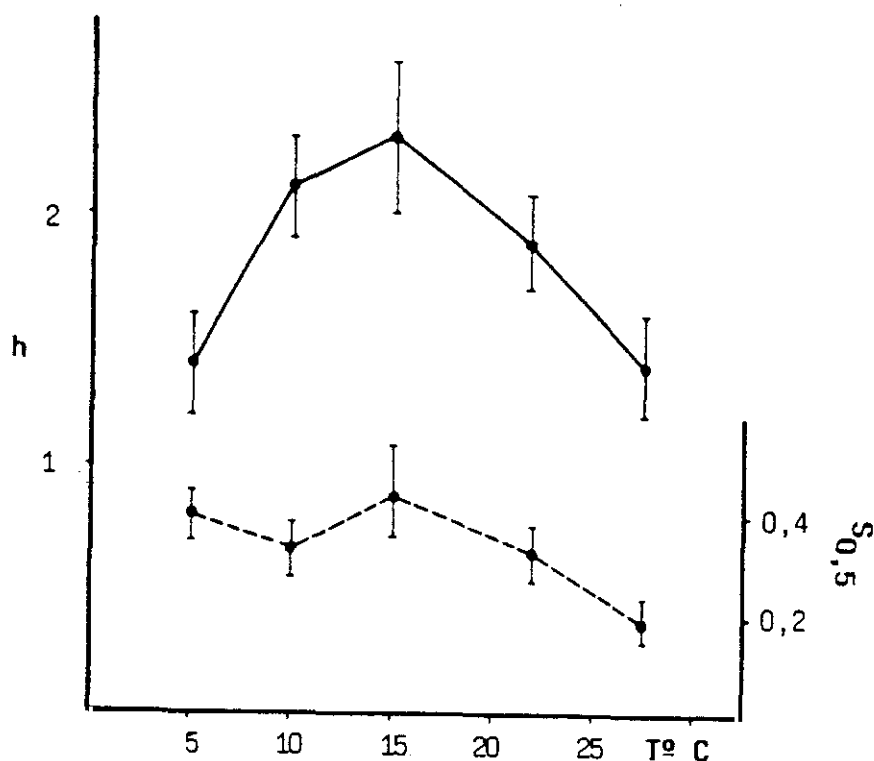


Figura 8.- Influencia de la temperatura en los parámetros cinéticos de PK respecto al PEP.

— h.  
 --- S<sub>0,5</sub>.

#### IV.3.2. INFLUENCIA DEL pH SOBRE EL COMPORTAMIENTO CINÉTICO DE LA PK.

Para comprobar si la piruvatoquinasa de músculo de lubina está sometida a regulación por la variación del pH, se realizaron los mismos experimentos que en el apartado IV.3.1. a un pH de 6,8 (fisiológico).

En la tabla V se recogen los parámetros cinéticos (coeficiente de Hill y S<sub>0,5</sub>) a los dos pHs (6,8 y 7,4), de la piruvatoquinasa respecto al PEP y a 22°C de temperatura. A pH 6,8 no se observa un cambio claro en la cooperatividad, aunque disminuye un poco el coeficiente de Hill, sin embargo, en relación con la afinidad se observa un gran aumento; reduciéndose la S<sub>0,5</sub> casi a la mitad. Respecto al ADP no se ha observado variación en sus parámetros cinéticos al variar el pH.

Tabla IV.- Efecto del pH sobre el comportamiento cinético de la PK respecto al PEP.

pH	h	So.s
6,8	1,57 ± 0,30	0,18 ± 0,03
7,4	1,88 ± 0,18	0,33 ± 0,06

#### IV.4. MODULADORES ALOSTÉRICOS: ESTUDIO DE SU EFECTO SOBRE LA ACTIVIDAD PK RESPECTO AL PEP.

##### IV.4.1. INFLUENCIA DE LA CONCENTRACIÓN DE EFECTORES SOBRE LA ACTIVIDAD DE LA PIRUVATOQUINASA.

La piruvatoquinasa está descrita como una enzima alostérica capaz de responder a una serie de metabolitos tal como se indicó el apartado II.5. Con objeto de caracterizar las propiedades reguladoras de la enzima en músculo de lubina y compararlas con las de la enzima de otros orígenes, se ha determinado el efecto que podían tener los moduladores citados en el apartado III.3.1.B sobre la actividad de la piruvatoquinasa, a dos concentraciones fijas de PEP (0,4 y 1 mM). Respecto al otro sustrato (ADP) no se observó modulación por ninguno de los efectores probados.

Los experimentos cuyos resultados se describen a continuación fueron realizados a pH 7,4 y 22°C. Sólo mostraron efecto la fructosa 1,6 bifosfato y la fructosa 2,6 bifosfato, la fenilalanina y la fosfocreatina. Los resultados de la influencia de su concentración sobre la actividad de PK se muestran en la figura 9. Se comprobó que la concentración de proteína en un rango de 25 a 750 µg/ml, no afectaba al comportamiento de la enzima, ni al efecto de los moduladores sobre ella.

La F-1,6-P<sub>2</sub> y la F-2,6-P<sub>2</sub> se comportaron como efectores positivos. La activación es patente a las concentraciones fisiológicas y va aumentando hasta llegar a un máximo a la concentración de 1 mM en la primera y de 0,1 mM para la segunda.

La fenilalanina y la fosfocreatina se comportaron como efectores negativos. A concentraciones fisiológicas presentan inhibición del 10 y del 50% respectivamente.

A la vista de estos resultados se procedió a caracterizar cinéticamente el efecto de la F-1,6-P<sub>2</sub> y la F-2,6-P<sub>2</sub> como activadores y de fenilalanina y fosfocreatina como inhibidores. En estos experimentos se usó la fructosa 1,6 bifosfato a concentración fisiológica, sin embargo, los demás se ensayaron a concentraciones diferentes a la intracelular. La concentración fisiológica de la F-2,6-P<sub>2</sub> y la fenilalanina es muy baja (Tabla II) y su influencia en la actividad piruvatoquinásica, en las condiciones experimentales empleadas por nosotros, es pequeña, por lo que se prefirió utilizar concentraciones más elevadas que nos permitieran observar los efectos conjuntos con mayor fiabilidad, una vez comprobado que los parámetros cinéticos no eran modificados por la concentración. Debido a que la cantidad de fosfocreatina en la célula es muy variable y para algunos autores sus efectos se consideran un artefacto de la experimentación, se utilizó una concentración menor a la intracelular (al ser esta elevada) para comprobar que estos efectos de regulación de la enzima y su interrelación con otros compuestos se deben sólo al fosfato de creatina. La influencia de este compuesto es muy importante ya que esta piruvatoquinasa, al contrario de lo que se describe en la literatura, según se señaló en el apartado I.4, no se inhibe por ATP.

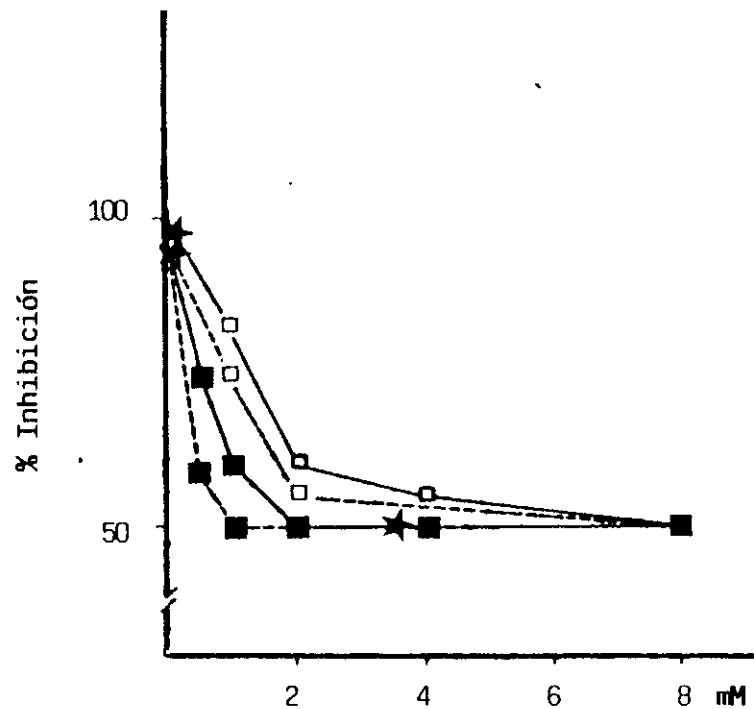
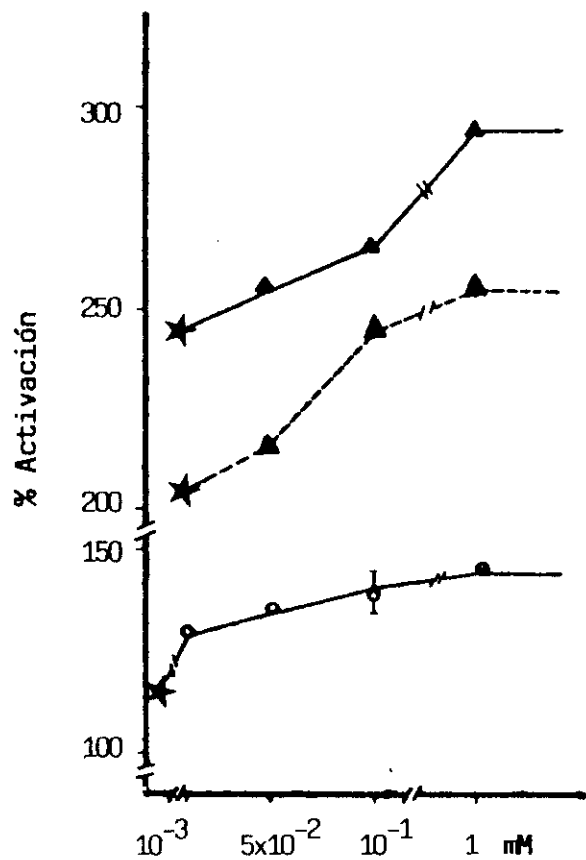


Figura 9.- Influencia de la concentración de efectores sobre la actividad PK. (—1 mM y -- 0,4 mM de PEP), ★ Concentración fisiológica.

A.- Activadores ○ F-2,6-P<sub>2</sub>.

▲ F-1,6-P<sub>2</sub>.

B.- Inhibidores □ fenilalanina.

■ fosfocreatina.

#### IV.4.2. ACTIVADORES

##### A.- Efecto de la fructosa 1,6 bifosfato.

En la figura 10 se muestra el efecto de F-1,6-P<sub>2</sub> sobre el comportamiento cinético de la PK. Actúa básicamente disminuyendo el coeficiente de Hill a  $1,3 \pm 0,17$  pero sin modificar la afinidad de la enzima ( $S_{0,5} = 0,33 \pm 0,03$  mM) y aumentando la V<sub>max</sub> un  $140\% \pm 22$ .

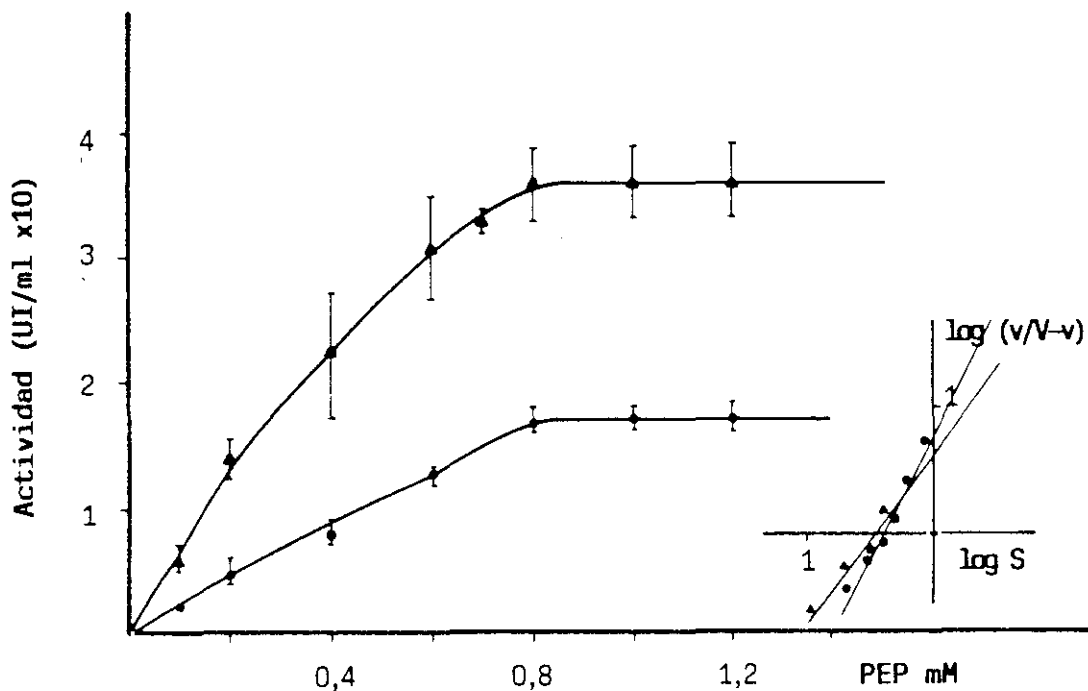


Figura 10.- Efecto de la F-1,6-P<sub>2</sub> sobre el comportamiento cinético de PK respecto al PEP.

Representación de Hill inserta.

● Control.

▲ + F-1,6-P<sub>2</sub> (0,01 mM).

Con objeto de profundizar en la termorregulación y siendo la F-1,6-P<sub>2</sub> el más característico efector de la PK de músculo en peces, se estudió la variación de su influencia en función de la temperatura. Se realizaron

los mismos experimentos que en el apartado IV.3.2. pero en presencia de F-1,6-P<sub>2</sub>.

En la figura 11 se puede observar que a todas las temperaturas ensayadas la F-1,6-P<sub>2</sub> mantiene su efecto activador y la disminución de la cooperatividad con respecto al control. Esta disminución es más apreciable a las temperaturas normales del hábitat (figura 11A). El porcentaje de activación sobre la V<sub>max</sub> varía también con la temperatura, se mantiene un alto porcentaje a 15 y 22°C, que disminuye drásticamente a las temperaturas extremas de 5 y 27°C (figura 11C). La afinidad en presencia de F-1,6-P<sub>2</sub> con respecto al control prácticamente no varía con la temperatura (figura 11B) aunque aumenta a 5°C y disminuye a 27°C ligeramente.

En presencia de F-1,6-P<sub>2</sub>, hay menor termorregulación ya que los parámetros cinéticos varían en una menor proporción que en ausencia de la misma. Para facilitar su comparación, los parámetros cinéticos en presencia y ausencia de F-1,6-P<sub>2</sub>, se han incluido en la tabla V.

Tabla V.- Influencia de la temperatura sobre el efecto de la fructosa 1,6 bifosfato.

Temperatura	Control		+ F-1,6-P <sub>2</sub>		%Activación
	h	S <sub>0.5</sub>	h	S <sub>0.5</sub>	
5°	1,4±0,23	0,4±0,03	1,3±0,14	0,2±0,06	15
10°	2,1±0,19	0,4±0,05	1,3±0,13	0,3±0,10	120
15°	2,3±0,30	0,4±0,09	1,8±0,20	0,5±0,08	190
22°	1,9±0,18	0,3±0,06	1,3±0,07	0,3±0,03	140
27°	1,4±0,20	0,2±0,04	1,2±0,09	0,3±0,10	50

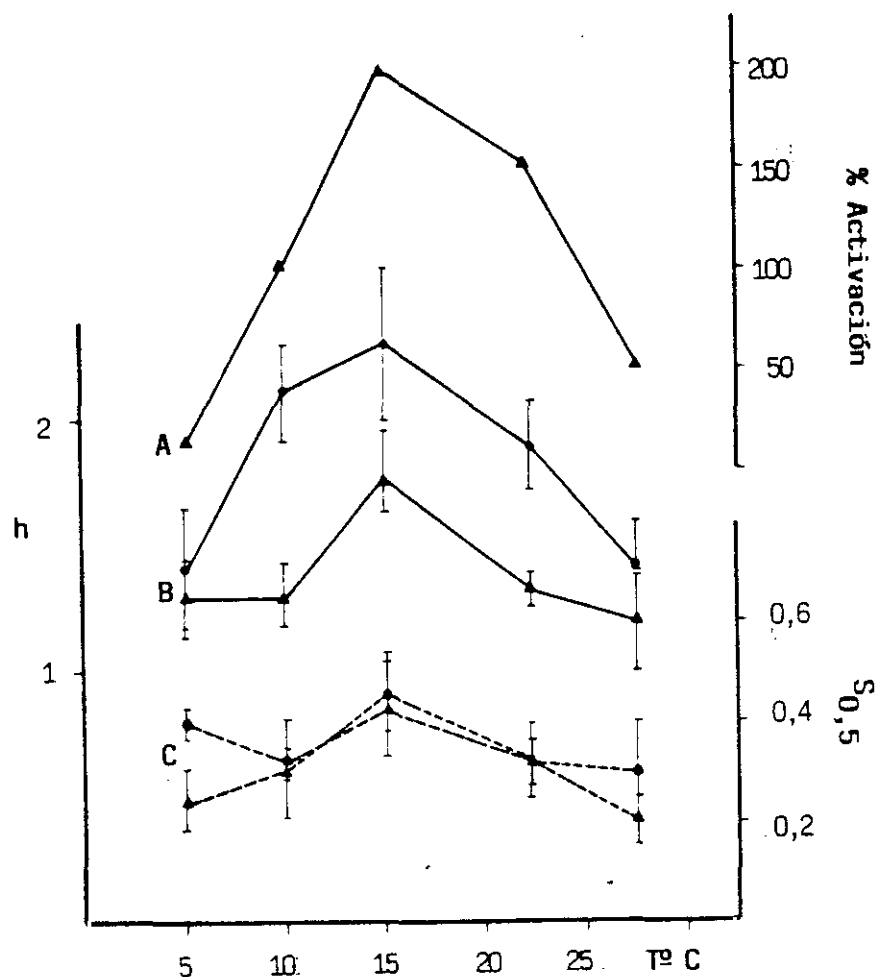


Figura 11.- Influencia de la temperatura sobre el efecto de F-1,6-P<sub>2</sub>.

( ● ) Control y ( ▲ ) + F-1,6-P<sub>2</sub>.

A.- Activación.

B.- Coeficiente de Hill.

C.- S<sub>0,5</sub>.

Con el fin de investigar si el efecto de la F-1,6-P<sub>2</sub> variaba con el pH se realizaron experimentos semejantes a los descritos en el apartado IV.3.3 en presencia de este activador. A pH fisiológico (6,8) se comporta practicamente igual que a 7,4 disminuyendo un poco la cooperatividad y sin afectar a la afinidad (Tabla VI). La presencia de F-1,6-P<sub>2</sub> no modifica la alteraciones producidas por el propio cambio de pH.

Tabla VI.- Influencia del pH sobre el efecto de la fructosa 1,6 bifosfato.

pH	Control		+ F-1,6-P <sub>2</sub>		%Activación
	h	So,s	h	So,s	
6,8	1,57±0,30	0,18±0,03	1,23±0,20	0,21±0,04	80
7,4	1,88±0,18	0,33±0,06	1,33±0,07	0,33±0,06	140

#### B.- Efecto de la fructosa 2,6 bifosfato.

En la figura 12 se muestra el comportamiento de la F-2,6-P<sub>2</sub> sobre la cinética de la PK a pH 7,4 y 22° C. Se puede observar que se comporta como activador con un porcentaje de activación de 30% ± 34, bastante inferior al anteriormente citado. Al igual que la F-1,6-P<sub>2</sub>, disminuye la cooperatividad positiva hasta obtener un valor del coeficiente de Hill de 1,36 ± 0,07 pero sin afectar a la afinidad ( $S_{0,5} = 0,33 \pm 0,06$  mM).

Con el fin de determinar el efecto del pH sobre la activación de la F-2,6-P<sub>2</sub> se realizaron experimentos similares a los descritos en el apartado IV.3.3 en presencia de dicho activador. La variación de pH de 7,4 a 6,8 en presencia de F-2,6-P<sub>2</sub> produce una modificación en los parámetros cinéticos semejante a la encontrada en su ausencia, disminuyendo el coeficiente de Hill y aumentando la afinidad. Los resultados se expresan en la tabla VII.



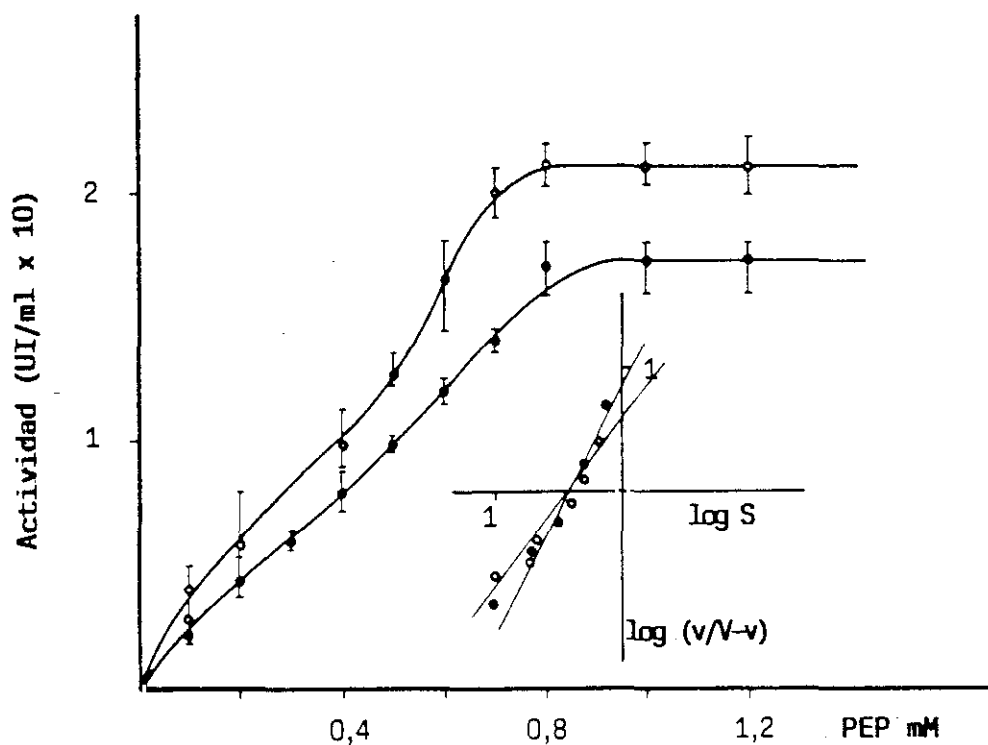


Figura 12.- Efecto de la F-2,6-P<sub>2</sub> sobre el comportamiento cinético de la piruvatoquinasa.  
Representación de Hill inserta.

- Control.
- + F-2,6-P<sub>2</sub> 0,1 mM.

Tabla VII.- Influencia del pH sobre el efecto de la fructosa 2,6 bifosfato.

pH	Control		+ F-2,6-P <sub>2</sub>		%Activación
	h	S <sub>0.5</sub>	h	S <sub>0.5</sub>	
6,8	1,57±0,30	0,18±0,03	1,05±0,07	0,19±0,01	45
7,4	1,88±0,18	0,33±0,06	1,36±0,07	0,30±0,06	30

### C.- Efecto conjunto de las dos hexosas.

Con el propósito de comprobar qué tipo de activación produciría el efecto conjunto de los dos moduladores se realizaron experimentos de dos formas:

- 1.- Adición de F-1,6-P<sub>2</sub> y posteriormente de F-2,6-P<sub>2</sub> y
- 2.- Adición primero de F-2,6-P<sub>2</sub> y a continuación de F-1,6-P<sub>2</sub>.

En ambos casos al añadir el segundo activador se observó un comportamiento aditivo de los efectos. Los dos experimentos mostraban cinéticas de tipo hiperbólico duplicándose la afinidad, lo que no se alcanza con ninguno de los dos activadores independientemente.

Un resumen de los parámetros cinéticos se muestra en la tabla VII. El porcentaje de activación final alcanzado es el mismo aunque se altere el orden de adición (172%  $\pm$  20 sobre el control). Como ejemplo se muestra la figura 13, en la que se ha añadido en primer lugar F-2,6-P<sub>2</sub> y después F-1,6-P<sub>2</sub>

Tabla VII.- Efecto de los activadores (F-1,6-P<sub>2</sub> y F-2,6-P<sub>2</sub>) sobre la actividad PK.

	h	So, s
PEP	1,88 $\pm$ 0,18	0,33 $\pm$ 0,06
PEP + F-2,6-P <sub>2</sub>	1,36 $\pm$ 0,07	0,30 $\pm$ 0,06
PEP + F-2,6-P <sub>2</sub> + F-1,6-P <sub>2</sub>	0,92 $\pm$ 0,07	0,15 $\pm$ 0,05
PEP + F-1,6-P <sub>2</sub>	1,33 $\pm$ 0,07	0,33 $\pm$ 0,03
PEP + F-1,6-P <sub>2</sub> + F-2,6-P <sub>2</sub>	1,15 $\pm$ 0,05	0,15 $\pm$ 0,05

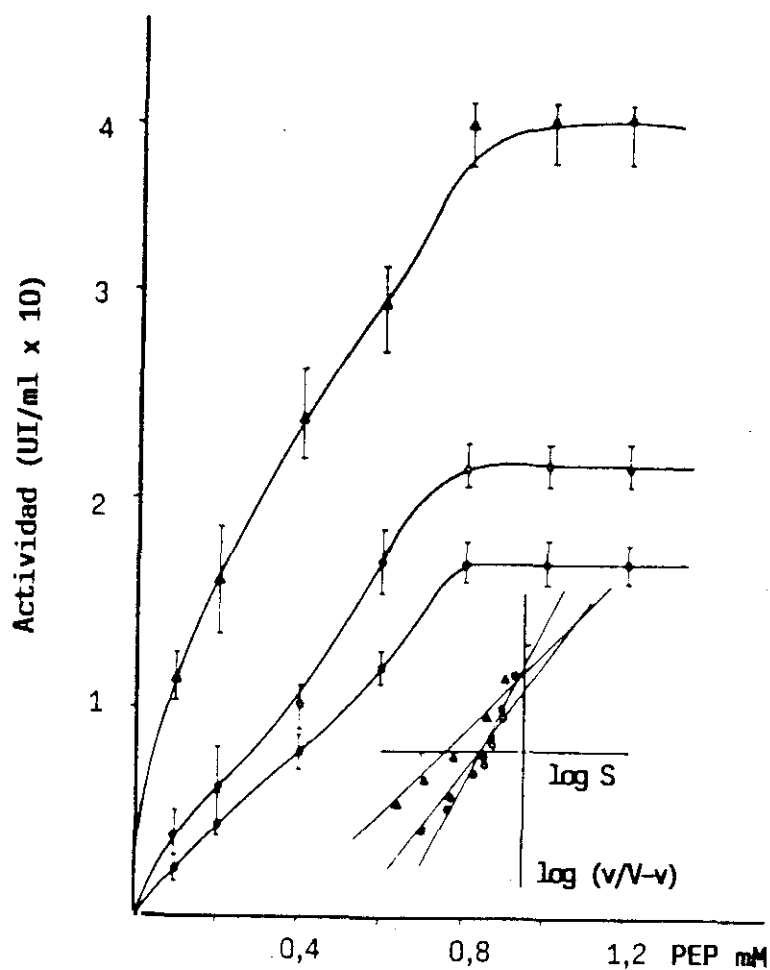


Figura 13.- Efecto conjunto de las dos hexosas bifosforiladas sobre el comportamiento cinético de la piruvatoquinasa. Representación de Hill inserta.

● Control.

○ + F-2,6-P<sub>2</sub> (0,1 mM).

▲ + F-2,6-P<sub>2</sub> (0,1 mM) + F-1,6-P<sub>2</sub> (0,01 mM).

#### IV.4.3. INHIBIDORES.

##### A.- Efecto de la fenilalanina.

El mecanismo cinético de inhibición se ha investigado estudiando su efecto, a una concentración de 1 mM, sobre la curva de saturación por PEP. En la figura 14 se

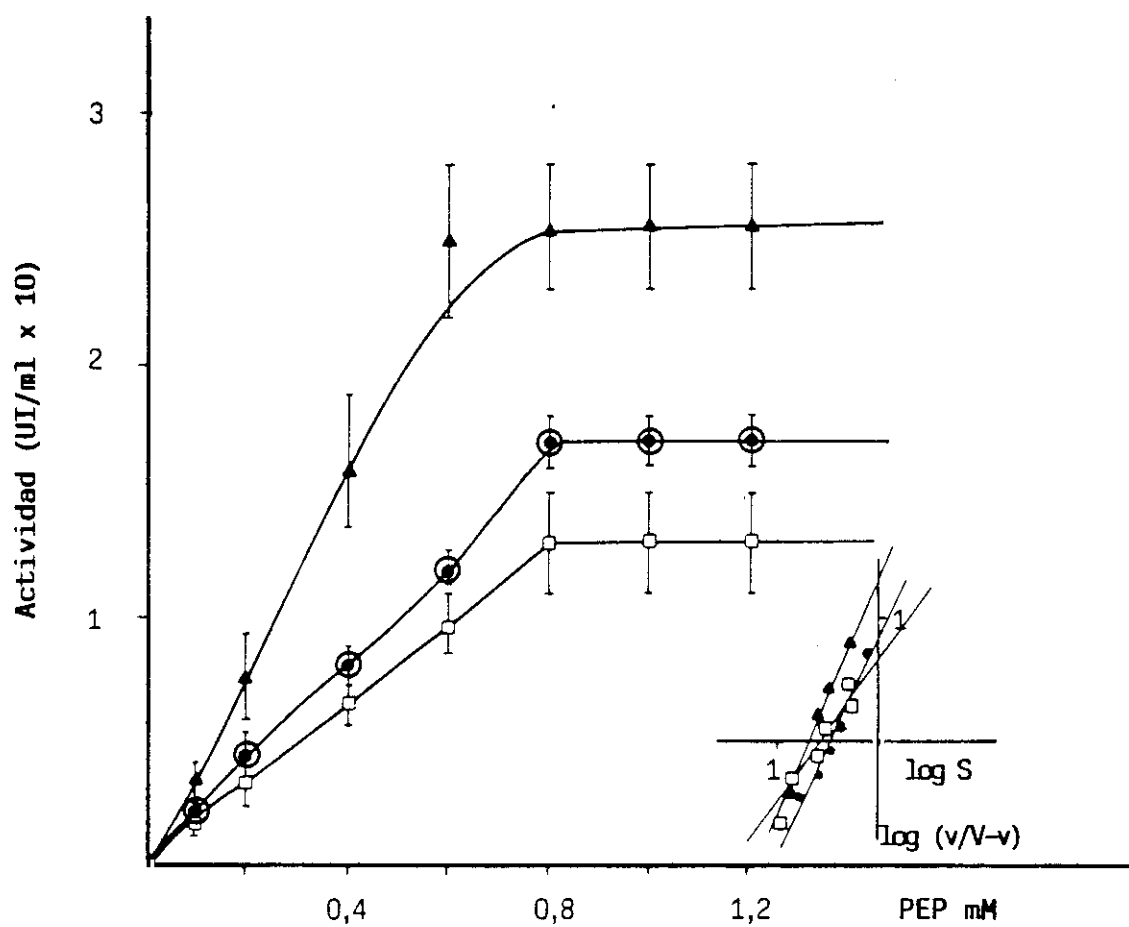


Figura 14.- Efecto de la fenilalanina sobre el comportamiento cinético de la piruvatoquinasa.

Representación del Hill inserta.

- Control.
- + Phe 1 mM.
- ▲ + Phe 1 mM + F-1,6-P<sub>2</sub> 0.01 mM
- + Phe 1 mM + F-2,6-P<sub>2</sub> 0.1 mM.

observa una disminución de la  $V_{max}$  del 25%, aumento de la cooperatividad positiva ( $h = 2,24 \pm 0,12$ ) y no varía prácticamente la afinidad ( $S_{0,5} = 0,28 \pm 0,05$  mM). Mediante la representación de Dixon se observa (figura 15A) la inhibición es acompetitiva total.

La F-1,6- $P_2$  (figura 14) elimina el efecto inhibidor, siendo capaz de manifestar una activación media del  $75\% \pm 24$  respecto al control. El coeficiente de Hill disminuye a  $1,43 \pm 0,17$  y la  $S_{0,5}$  no varía ( $0,3 \pm 0,06$  mM). Por el contrario la F-2,6- $P_2$  elimina el efecto inhibidor pero sin sobrepasar el control y mantiene los parámetros éste (figura 14).

#### B.- Efecto de la fosfocreatina.

La inhibición producida por una concentración de 0,5 mM sobre la piruvatoquinasa respecto al PEP se muestra en la figura 16. Se observa una disminución de la  $V_{max}$  de un 40%, aumento del coeficiente de Hill ( $h = 2,37 \pm 0,2$ ) y no hay variación de la afinidad ( $S_{0,5} = 0,31 \pm 0,06$  mM). Por medio de la representación de Dixon se ha determinado (Fig. 15B) que el tipo de inhibición es competitiva total con una  $K_i$  de 0,5 mM.

Al igual que sucede con la Phe, la F-1,6- $P_2$  (figura 16) elimina el efecto inhibidor de la fosfocreatina, produciendo un aumento de la velocidad máxima de  $34\% \pm 12$  respecto al control, ligera disminución de la cooperatividad ( $h = 1,56 \pm 0,1$ ) y aumento de la afinidad ( $S_{0,5} = 0,25 \pm 0,01$  mM). En presencia de F-2,6- $P_2$  (figura 16) el efecto inhibidor se revierte, pero solo hasta igualar el control y mantiene los mismos parámetros cinéticos que éste.

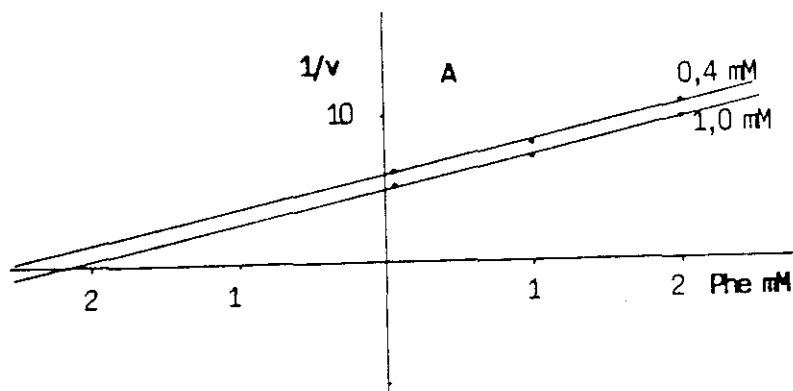
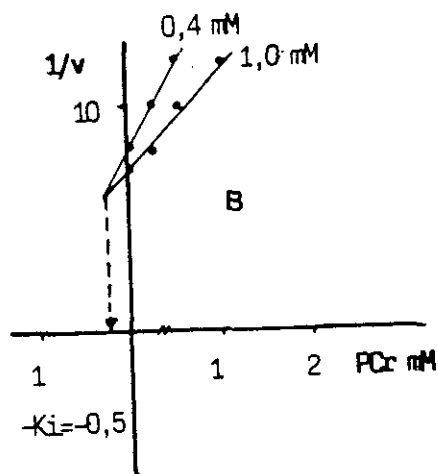


Figura 15.- Representación de Dixon para la inhibición por:

A.- fenilalanina .

B.- fosfocreatina.

#### C.- Efecto conjunto de inhibidores.

Se realizaron los mismos experimentos que en el apartado IV.4.2.C. con la presencia conjunta de los dos inhibidores y en ausencia de activadores. Una vez que actúa uno de los inhibidores, al añadir el otro no se observa ningún aumento del efecto inhibitor, ni variación en los parámetros cinéticos, lo que nos indica que la inhibición producida por el efecto conjunto de ambos moduladores no es aditiva, ni sinérgica.

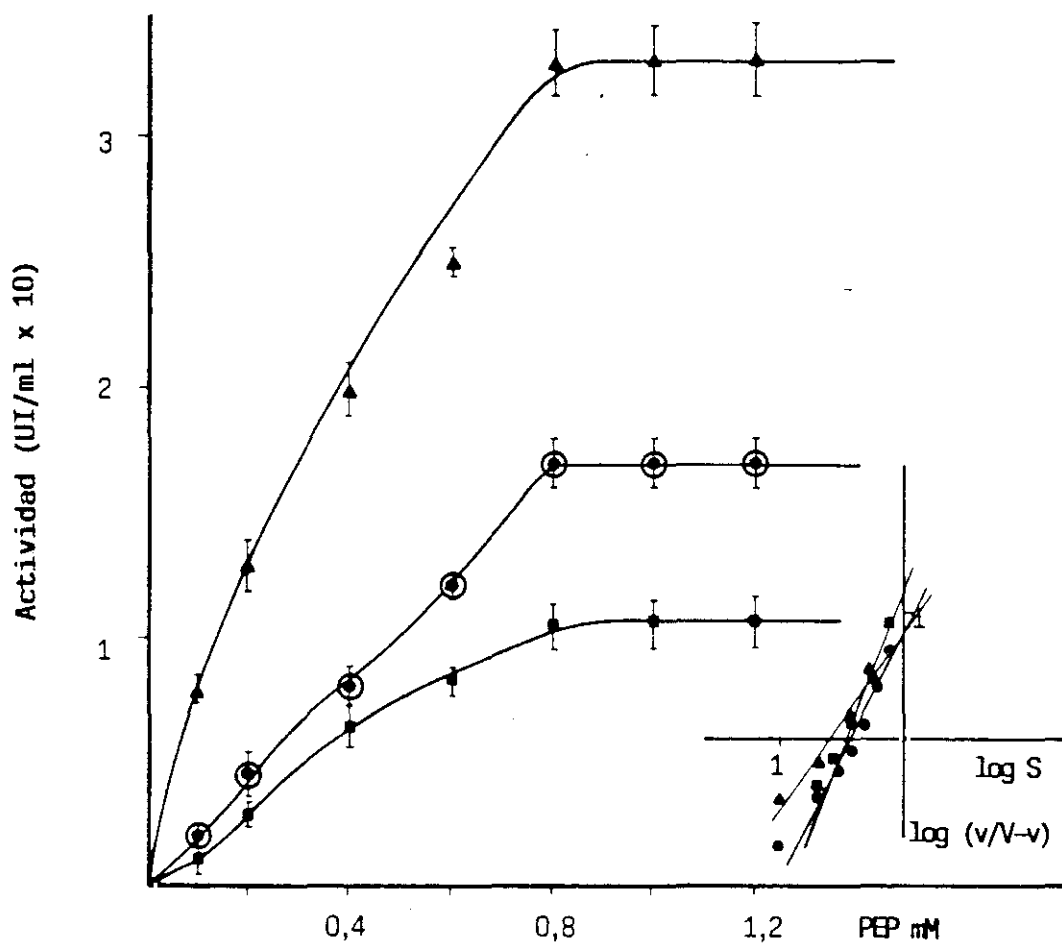


Figura 16.- Efecto de la fosfocreatina en el comportamiento cinético de la piruvatoquinasa.

Representación de Hill inserta.

- Control.
- + fosfocreatina 0,5 mM.
- ▲ + fosfocreatina 0,5 mM + F-1,6-P<sub>2</sub> 0,01 mM.
- + fosfocreatina 0,5 mM + F-2,6-P<sub>2</sub> 0,1 mM.

## **V. RESULTADOS: FOSFOFRUCTOQUINASA.**

### **V.1. ESTUDIOS PRELIMINARES DE LA ENZIMA.**

Todos los estudios realizados sobre la enzima reflejados en este apartado se han llevado a cabo en extracto crudo, con el objeto de establecer las condiciones óptimas de mantenimiento, aislamiento y purificación de la enzima y para comparar posteriormente los resultados obtenidos con los observados con la enzima purificada.

#### **V.1.1. EXPLORACIÓN DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA EN DIVERSOS ORGANOS DE LUBINA.**

Se valoraron las actividades enzimáticas de la PFK en músculo, corazón, hígado y riñón, en las condiciones estandar de ensayo, según se describe en el apartado II.2.3.

El tejido donde se encontró mayor actividad específica de esta enzima fue el músculo (222 mU/mg), al igual que sucedía con la piruvatoquinasa, alcanzando sólo el 4,86% de este valor la enzima de corazón, la de riñón 1,26% y la de hígado un 1%.

#### **V.1.2 PROPIEDADES FISICO-QUÍMICAS DE LA ENZIMA.**

##### **A.- Estabilidad enzimática de la PFK.**

Conocida la existencia de la mencionada actividad enzimática, con el fin de realizar los ensayos en las condiciones óptimas de extracción y conservación de la PFK, se realizaron experimentos previos para establecer las condiciones que mejor favorezcan la estabilidad de la enzima en relación el tiempo.



Se probaron como medios de extracción de la enzima varias disoluciones reguladoras: Tris-HCl, fosfato dipotásico y monopotásico, habiéndose observado una mayor estabilidad en relación con el tiempo con fosfato monopotásico 50 mM, pH 8,0. Esta última disolución se eligió como medio de extracción y en ella se estudió la influencia de otros agentes descritos como estabilizantes.

Para estudiar la estabilidad de la enzima respecto al tiempo, a las temperaturas de -20 y 4°C en presencia de los siguientes compuestos a las concentraciones que se indican: Glicerol 20% (v/v); F6P (0,2 y 1 mM), ATP<sup>4-</sup> (0,2 y 1 mM); DTT 5 mM; MET 5 mM y EDTA 1 mM.

A la temperatura de 4°C, observamos una pérdida bastante acusada respecto al tiempo, en presencia de todos los compuestos mayor que cuando la enzima se mantiene en ausencia de ellos. Únicamente la adición de F6P 0,2 mM mantiene el 50% de la actividad al igual que en el control, después de siete días, mientras que con los demás la actividad es prácticamente nula.

A la temperatura de -20°C, se observa un mayor descenso de la actividad que en el caso anterior, ya que a las 72 h no hay actividad en los extractos a los que se ha añadido DTT, MET o ATP y en los que se ha adicionado EDTA o glicerol se detecta sólo un 18%. A los 7 días el control conserva el 65% de actividad y con F6P 0,2 mM el 55%.

A la vista de estos resultados se utilizó siempre el extracto en tampón fosfato monopotásico sin ningún aditivo, y se conserva a -20°C hasta el momento de su utilización.

## B.- Influencia del pH.

El efecto del pH sobre la actividad enzimática se muestra en la figura 17A. Se determinaron las actividades a una temperatura de 22° C y a diferentes valores de pH (4 a 11), según el método descrito en el apartado II.2.5.B. Se observa un máximo de actividad (100%) a pH 8 con tampón Tris-HCl. A partir de este máximo hay una disminución brusca y simétrica a ambos lados de la curva. En este mismo tampón y a pH 7,5 la actividad es sólo del 50% y a 8,5 del 75%.

La influencia del pH sobre la estabilidad de la PFK, se determinó según se describe en el apartado II.2.5.B. Los resultados obtenidos (figura 17B) muestran que la PFK conserva el 100% de actividad en un rango de pH de 7 a 9, manteniendo mas del 50% de actividad en el intervalo de pH de 6 a 9.

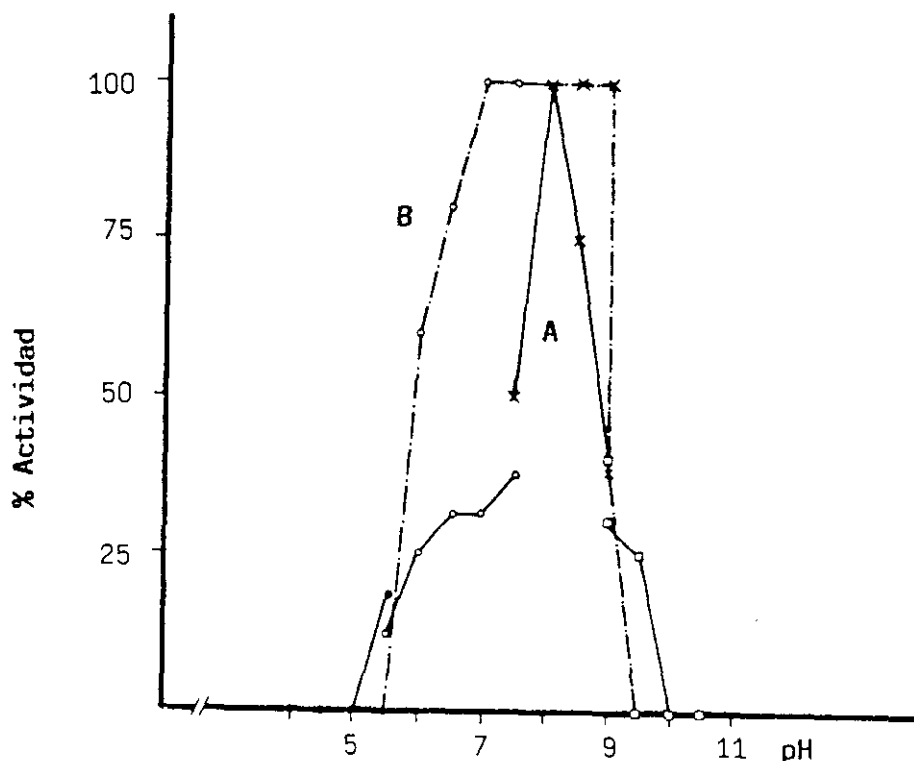


Figura 17.- Influencia del pH sobre (A) la actividad y (B) la estabilidad de la PFK.

(●) Acetato potasio, (○) Tris maleico, (\*) Tris-HCl, (□) Glicina.

### C.- Influencia de la temperatura.

El efecto de la temperatura sobre la actividad de la fosfofructoquinasa se observa en la figura 18A. La actividad enzimática aumenta progresivamente hasta un valor máximo a 50°C, a partir del cual desciende bruscamente hasta los 60°C donde ya es prácticamente nula. De la representación de Arrhenius se ha obtenido un valor de  $E_a$  de 34,3 KJ/mol. El valor del coeficiente de temperatura,  $Q_{10}$ , en el intervalo de 5 a 50°C es de  $1,58 \pm 0,57$ .

La influencia de la temperatura sobre la estabilidad enzimática se muestra en la figura 18B. La enzima conserva el 100% de actividad desde -20°C hasta 35°C, descendiendo bruscamente para anularse a 70°C.

### V.1.3. PROPIEDADES CINÉTICAS DE LA FOSFOFRUCTOQUINASA.

#### A.- Influencia de la concentración de sustratos sobre la actividad de la enzima.

a.- Fructosa 6 fosfato. Con objeto de conocer el comportamiento de la enzima respecto a su sustrato F6P, se variaron las concentraciones (0,01-2 mM) del mismo, manteniendo una temperatura de 22° C, un pH de 8.

La figura 19A muestra la curva de saturación respecto a F6P. Se puede observar un comportamiento cinético bifásico con una meseta intermedia entre 0,25 y 0,4 mM. Esta falta de sensibilidad relativa en determinados intervalos de concentración podrían corresponder (Teipel y Koshland, 1969) con una transición desde cinética con cooperatividad negativa hasta michaeliana.

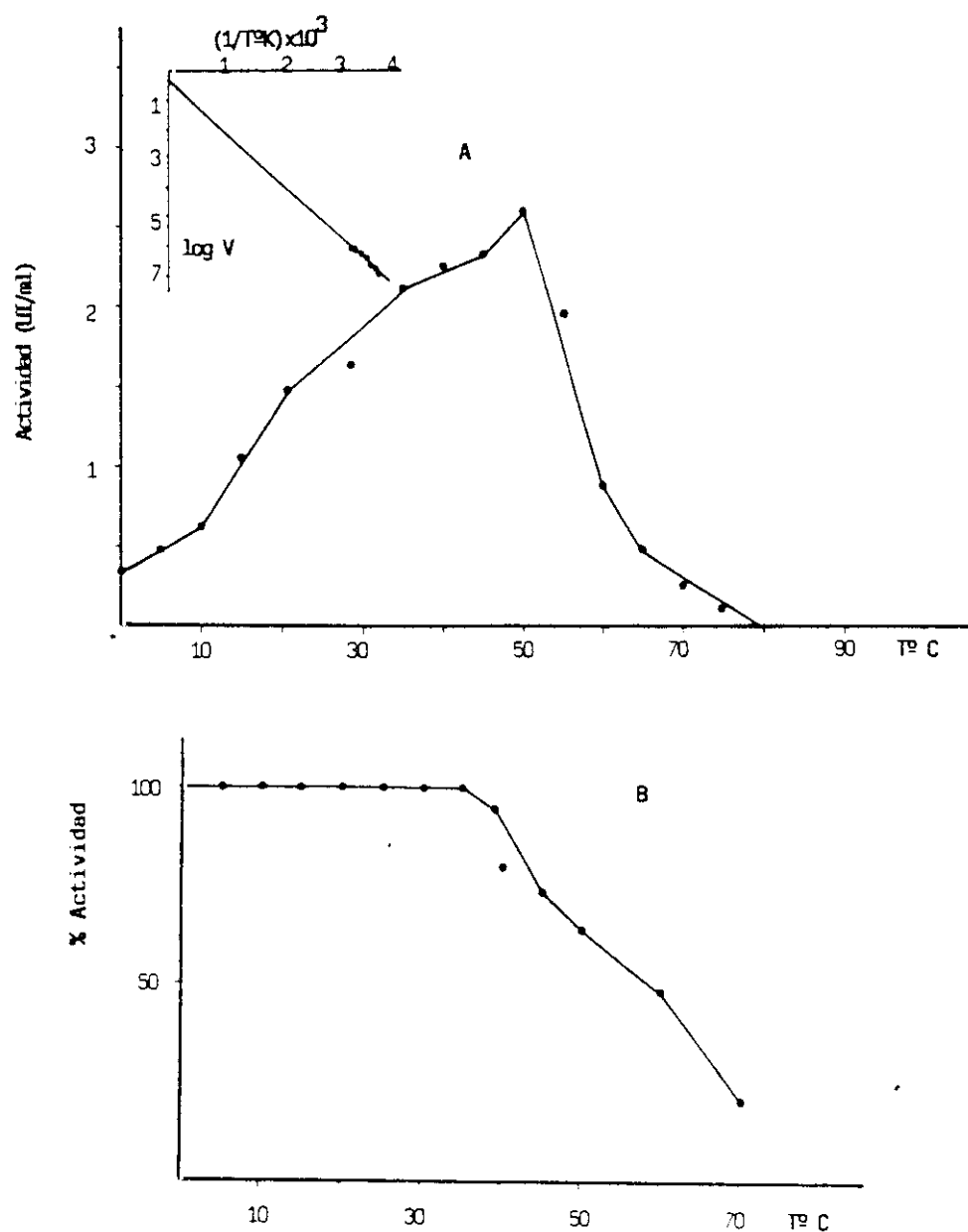


Figura 18.- Efecto de la temperatura sobre (A) la actividad y (B) la estabilidad de la PFK.

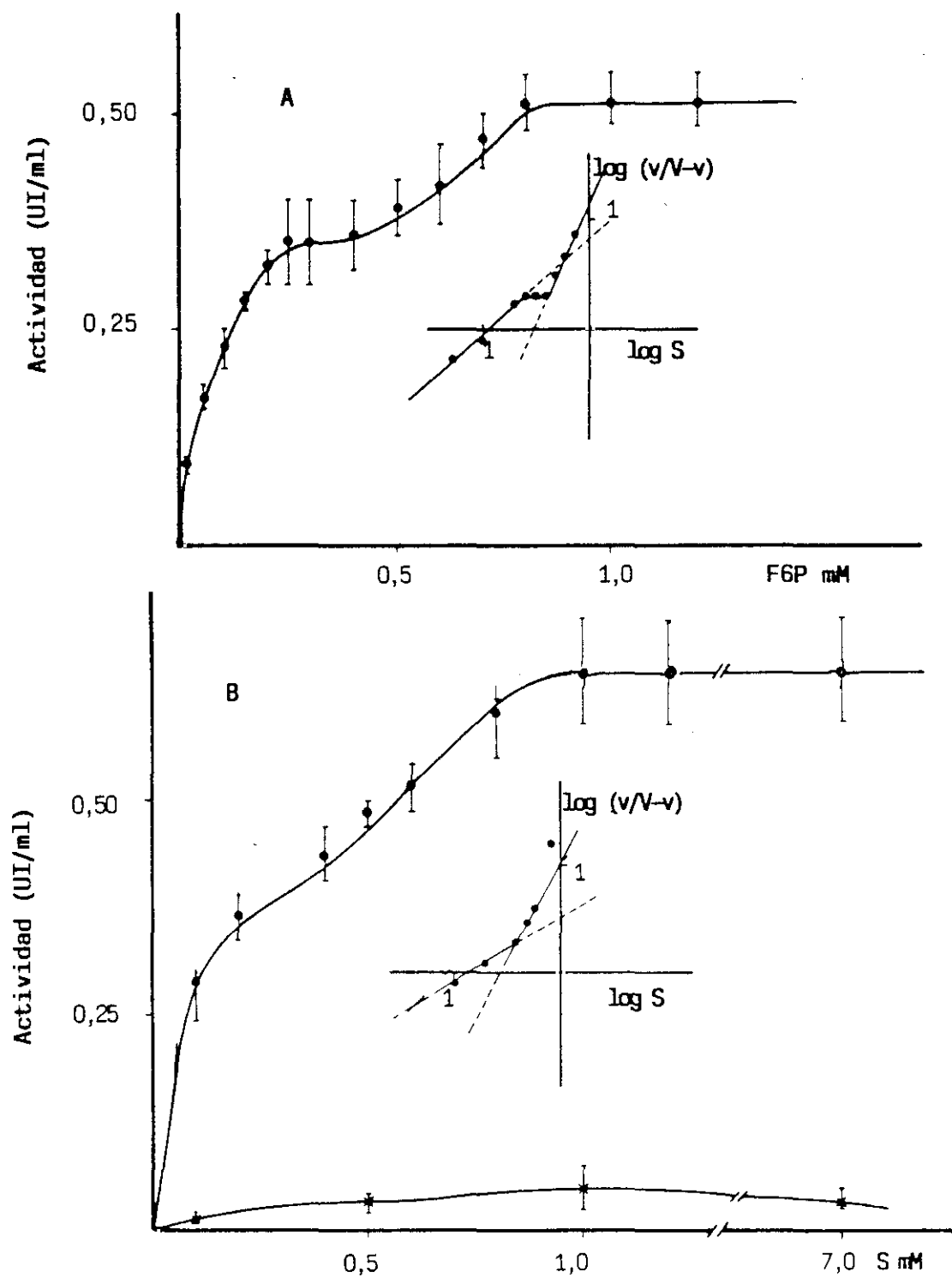


Figura 19.- Influencia de la concentración de sustratos sobre la actividad PFK.  
Representación de Hill inserta.

A.- F6P.

B.-  $\text{MgATP}^{2-}$  ●

$\text{ATP}^{4-}$  \*

e incluso hasta cinética con cooperatividad positiva, a medida que aumenta la concentración de ligando.

Al realizar la representación de Hill se ha comprobado un aumento en el grado de cooperatividad a medida que aumenta la concentración del sustrato (0,01 a 0,3 mM  $h = 0,96 \pm 0,26$  y de 0,3 a 1mM  $h = 2,36 \pm 0,15$ ), pasando de una cinética michaeliana a una con cooperatividad positiva.

A altas concentraciones de sustrato, la enzima muestra una menor afinidad ( $S_{0,5} = 0,28 \pm 0,02$  mM) que a bajas concentraciones ( $S_{0,5} = 0,12 \pm 0,04$  mM)

b.- **Complejo  $MgATP^{2-}$ .** Según se indicó en el apartado 1.6., el ATP puede unirse a cationes metálicos de diversas valencias pudiéndose considerar el  $MgATP^{2-}$  como el verdadero sustrato de esta enzima. Para el cálculo de las concentraciones de las posibles especies iónicas presentes se ha considerado un valor de la constante de estabilidad para la formación de este complejo, a pH 8, de  $75.000 M^{-1}$  (O'Sullivan y Perrin, 1964). A este valor de pH, la formación de  $HATP^{3-}$  y  $HMgATP^{-}$  es despreciable, así como la unión del  $Mg^{2+}$  a la F6P.

En la figura 18B se observa la cinética de la PFK respecto a la concentración de  $MgATP^{2-}$  y respecto al  $ATP^{4-}$ .

Al obtenerse la máxima actividad utilizando el  $MgATP^{2-}$ , se puede considerar que el verdadero sustrato de la PFK de músculo de lubina es este complejo. La debil actividad observada en ausencia de  $Mg^{2+}$ , es debida solamente a la unión del  $ATP^{4-}$  a la enzima ya que la

presencia del catión en la mezcla de reacción puede considerarse despreciable.

La cinética respecto al  $\text{ATP}^{4-}$  es hiperbólica con una  $K_m$  de 0,43 mM. Respecto al  $\text{MgATP}^{2-}$  la cinética es bifásica, con una meseta intermedia de 0,25 a 0,4 mM y una transición de cooperatividad negativa a positiva, al igual que ocurría con el otro sustrato, al aumentar la concentración (de 0,01 a 0,3 mM  $h = 0,71 \pm 0,08$  y de 0,3 a 1 mM  $h = 1,5 \pm 0,2$ ).

La afinidad es mayor en el tramo inferior ( $S_{0,5} = 0,12 \pm 0,03$ ) que en el superior ( $S_{0,5} = 0,24 \pm 0,05$ ).

**b.I.- Relación con el  $\text{Mg}^{2+}$ .** En presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  libre (2,5 mM), en exceso sobre el  $\text{MgATP}^{2-}$ , se observa (figura 20) que desaparece la zona de transición, convirtiéndose la cinética en michaeliana y saturándose la enzima a una concentración del sustrato de 0,8 mM.

Se ha podido comprobar que todas las concentraciones fijas de  $\text{Mg}^{2+}$  libre probadas, a partir de 1 mM, convierten la cinética en hiperbólica y se mantienen prácticamente los mismos parámetros cinéticos según se muestra en la tabla IX.

Tabla IX.- Efecto de diferentes concentraciones de  $\text{Mg}^{2+}$  sobre la actividad de PFK.

		1,0 mM	2,5 mM	3,0 mM	5,0 mM
h	Bifásica		$1,07 \pm 0,08$	$0,99 \pm 0,10$	$1,13 \pm 0,11$
$S_{0,5}$	Bifásica		$0,17 \pm 0,03$	$0,22 \pm 0,06$	$0,23 \pm 0,07$

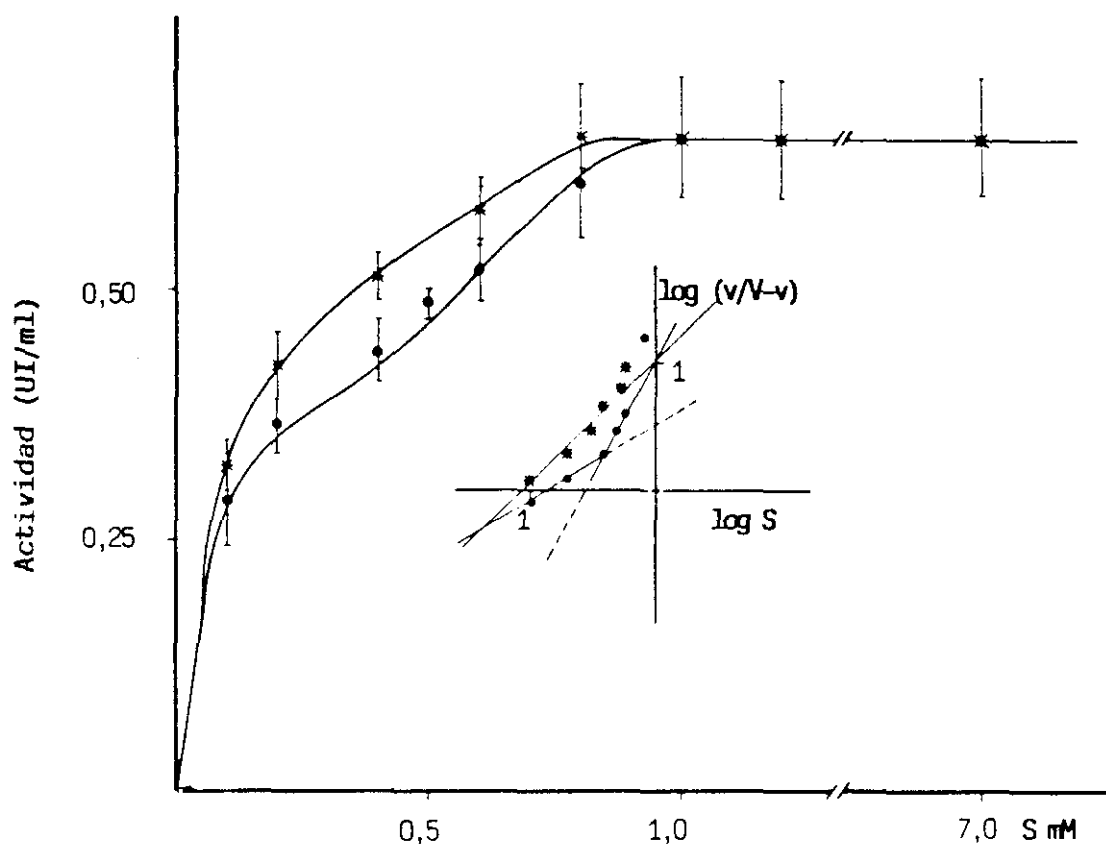


Figura 20.- Efecto de 2,5 mM  $Mg^{2+}$  libre sobre la cinética de la PFK respecto al  $MgATP^{2-}$ .

Representación de Hill inserta.

● Control.

\* + 2,5 mM  $Mg^{2+}$ .

Además se realizaron curvas de saturación con concentraciones variables de  $Mg^{2+}$ . Para ello se mantuvo una concentración fija de  $Mg^{2+}$  y se fué variando la concentración de ATP. Con 24 mM constante de  $Mg^{2+}$  y ATP variable de 0 a 6 mM (condiciones semejantes a las fisiológicas), la cinética es también hiperbólica ( $h = 1,06 \pm 0,1$ ) y la afinidad es semejante a la encontrada en presencia de concentraciones fijas de  $Mg^{2+}$  ( $K_m = 0,12 \pm 0,05$ ).

Se probó también la relación fisiológica 9:1 ( $Mg^{2+}:ATP^{4-}$ ) en todos los puntos y la cinética mostró una ligera cooperatividad negativa ( $h = 0,85 \pm 0,035$ ) y una mayor afinidad ( $S_{0,5} = 0,056 \pm 0,01$  mM) que en los demás experimentos en presencia de magnesio libre.



Todos los parámetros cinéticos obtenidos en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  son comparables, siendo significativamente distintos solo los realizados con la proporción intracelular. Ninguna concentración de  $\text{Mg}^{2+}$  libre incrementa la  $V_{\text{max}}$ .

b.II.- Tipo de inhibición por  $\text{ATP}^{4-}$ . En la figura 21 se muestra la influencia de la concentración del  $\text{ATP}^{4-}$  libre sobre el comportamiento cinético respecto al  $\text{MgATP}^{2-}$ . En la representación de Dixon se observan dos grupos de rectas que se cruzan en puntos diferentes, una correspondiente al tramo superior de la curva de saturación y otra al tramo inferior.

Para altas concentraciones de  $\text{MgATP}^{2-}$ , la  $K_i$  del  $\text{ATP}^{4-}$  es de 1,5 mM y para bajas concentraciones de 3,2 mM.

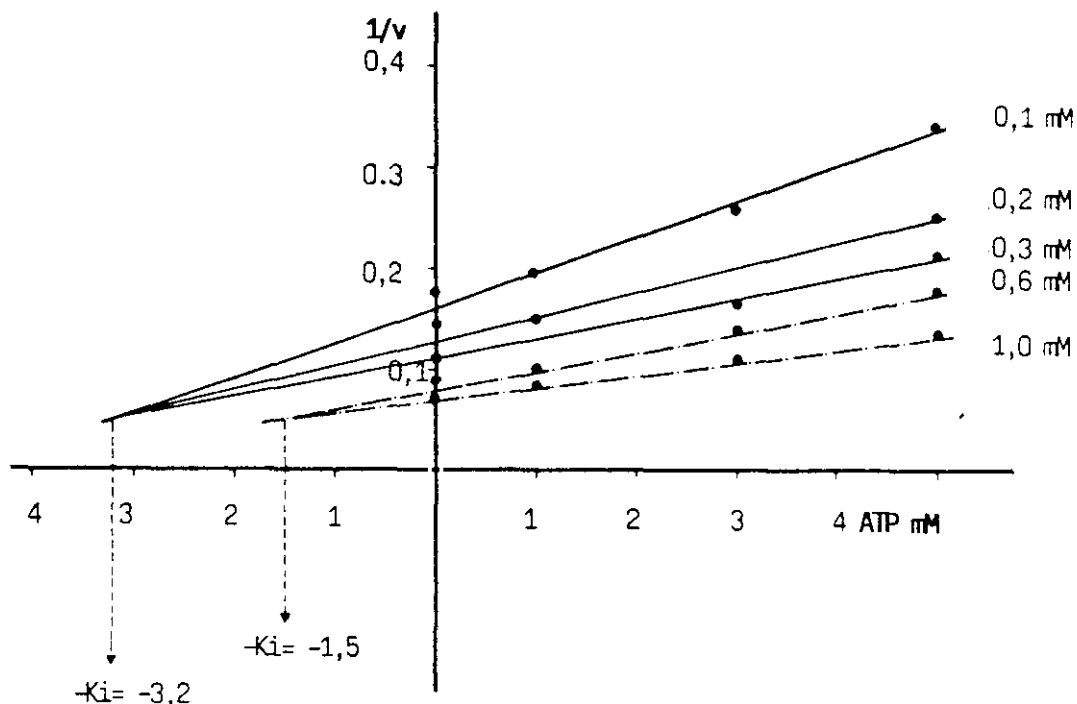


Figura 21.- Inhibición de la actividad PFK por  $\text{ATP}^{4-}$ .

(—) Bajas concentraciones de  $\text{MgATP}^{2-}$ .

(-- ) Altas concentraciones de  $\text{MgATP}^{2-}$ .

Se ha determinado el porcentaje de inhibición por  $\text{ATP}^{4-}$  libre respecto a la  $V_{\text{max}}$ , con unas concentraciones dentro del rango en el que fisiológicamente podría variar el ATP en el esfuerzo muscular. Los resultados muestran que por debajo de 1 mM de  $\text{ATP}^{4-}$  libre no se observa inhibición; a 1,5 mM hay un  $9,1 \% \pm 1,5$  de inhibición y a 2,5 mM un  $18,7 \% \pm 1,5$ . A la concentración fisiológica (2,75 mM) hay un  $25,0 \% \pm 0,8$  de inhibición. El 50% se alcanza a 5,5 mM ( $50 \% \pm 8,8$ ). Otras concentraciones probadas han sido 3,5 y 4,5 mM que dan un  $28 \% \pm 4$  y un  $43 \% \pm 7,6$  de inhibición respectivamente.

#### B.- Moduladores.

a.- Efecto de la temperatura. Los resultados obtenidos respecto a los dos sustratos a las temperaturas de 5, 10, 15, 22 y 27°C se muestran en la figura 22.

A todas las temperaturas se mantiene el comportamiento bifásico de las curvas de saturación frente a los dos sustratos y la zona intermedia de transición siempre se encuentra situada entre 0,25 y 0,4 mM.

Respecto a la F6P (figura 22A) y a bajas concentraciones no se observa claramente termorregulación. A altas concentraciones se observa una disminución de la cooperatividad al pasar de 5 a 15° C, dándose el máximo a 22° C. La afinidad en ambos tramos aumenta ligeramente a 5° C.

Respecto al  $\text{MgATP}^{2-}$  (figura 22B) se observa que en el tramo inferior de la curva bifásica, la cinética varía de michaeliana a cooperatividad negativa conforme aumenta la temperatura. En la zona superior se produce una disminución muy brusca de la cooperatividad al

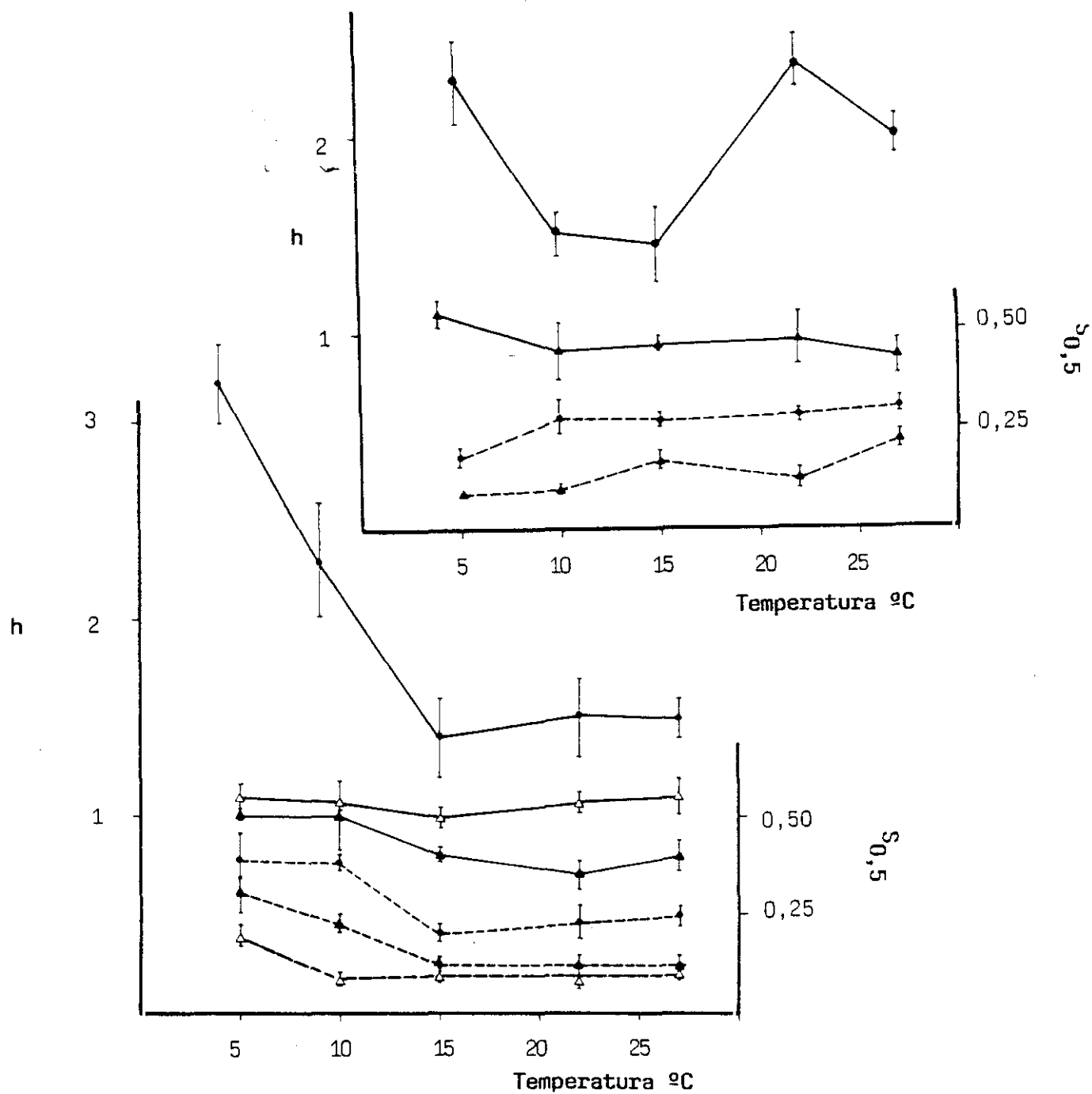


Figura 22.- Influencia de la temperatura sobre la PFK respecto a (A) F6P y (B) MgATP<sup>2-</sup>.

- h
- S<sub>0,5</sub>
- Altas concentraciones de sustrato.
- ▲ Bajas concentraciones de sustrato.
- △ + 2,5 mM Mg<sup>2+</sup>.

pasarde 5 a 15°C. En ambos tramos de la curva la afinidad alcanza un valor máximo a 15° C, a partir de la cual se mantiene prácticamente estable.

Con 2,5 mM  $Mg^{2+}$  libre sobre  $MgATP^{2-}$  (figura 22B) no se observa clara termorregulación, elimina siempre la cinética bifásica que presenta la curva de saturación para este sustrato . A 10 y 15°C se observa un aumento de la  $V_{max}$  en presencia del  $Mg^{2+}$  libre del  $25\% \pm 7,3$  y  $55\% \pm 15,5$  respectivamente.

También se estudió el efecto de la temperatura sobre la inhibición de PFK por  $ATP^{4-}$  libre y los resultados se muestran en la tabla X. A la concentración intracelular de ATP (2,75 mM) se puede observar que el porcentaje de inhibición disminuye al disminuir la temperatura, no viéndose inhibición a 5°C. A concentraciones mayores (5,5 mM) la disminución se observa a partir de 22°C, siendo tambien nula a 5°C.

Tabla X.- Influencia de la temperatura sobre la inhibición de la PFK por  $ATP^{4-}$ .

Temperatura °C	% Inhibición.	
	2,75 mM ATP	5,5 mM ATP
27	28,6 $\pm$ 2,1	39,0 $\pm$ 5,2
22	25,0 $\pm$ 0,8	50,0 $\pm$ 8,8
15	22,7 $\pm$ 1,3	24,6 $\pm$ 0,6
10	17,2 $\pm$ 0,6	19,7 $\pm$ 4,2
5	-----	-----

b.- Efecto del pH. La influencia del pH sobre los parámetros cinéticos de la PFK respecto a sus dos sustratos se muestra en la tabla XI. A ninguno de los dos pHs ensayados: pH 8,0 (óptimo) y pH 6,8 (más cercano al fisiológico) y no se aprecian cambios significativos respecto a F6P. En relación al  $\text{MgATP}^{2-}$  se observa un aumento de cooperatividad en los dos tramos pero no varía marcadamente la afinidad.

Tabla XI.- Influencia del pH sobre los parámetros cinéticos de la PFK.  
Concentración de sustrato (A) de 0-0,3 mM y (B) de 0,3-1 mM

pH	Sustrato	$k_a$	$k_b$	$S_{0.5a}$	$S_{0.5b}$
8,0	F6P	$0,96 \pm 0,26$	$2,36 \pm 0,15$	$0,12 \pm 0,04$	$0,28 \pm 0,19$
6,8	F6P	$0,88 \pm 0,20$	$2,67 \pm 0,30$	$0,11 \pm 0,04$	$0,28 \pm 0,02$
8,0	$\text{MgATP}^{2-}$	$0,71 \pm 0,08$	$1,50 \pm 0,20$	$0,12 \pm 0,03$	$0,23 \pm 0,05$
6,8	$\text{MgATP}^{2-}$	$1,06 \pm 0,13$	$2,25 \pm 0,20$	$0,19 \pm 0,07$	$0,28 \pm 0,03$

En ninguno de los experimentos realizados en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  libre se observa cambio en los parámetros cinéticos, al disminuir el pH a 6,8, únicamente hay un ligero incremento de la  $V_{\text{max}}$  (15%) en presencia de  $\text{Mg}^{2+}$  2,5 mM libre y constante.

Respecto al efecto del pH sobre la inhibición de la PFK por  $\text{ATP}^{4-}$ , se observó una notable reducción del porcentaje de inhibición al pH mas cercano al fisiológico (6,8), ya que a la concentración de 2,75 mM solo era del 10%, a 2,5 mM del 7% y del 3% a 1,5 mM. El máximo de inhibición se conseguía a partir de 3,5 mM y era del 16%.

c.- **Efectores.** Se ensayaron sobre la actividad fosfofructoquinásica, a diferentes concentraciones de sus dos sustratos,  $\text{MgATP}^{2-}$  y F6P. Concentraciones fisiológicas de citrato, ADP,  $\text{NH}_4^+$ , F-1,6- $\text{P}_2$ , F-2,6- $\text{P}_2$ , PEP, fosfocreatina, alanina y fenilalanina no manifestaron ninguna influencia. Para los efectores más característicos de esta enzima se probaron también concentraciones más elevadas: F-1,6- $\text{P}_2$  hasta 0,1 mM; ADP hasta 1 mM; citrato hasta 1,2 mM ; F-2,6- $\text{P}_2$  hasta 0,25 mM y G-1,6- $\text{P}_2$  a 0,1 y 0,25 mM. Solo se observó un ligero efecto de la F-2,6- $\text{P}_2$  por encima de 0,05 mM.

## V.2. PURIFICACIÓN E INVESTIGACIÓN DE FORMAS ENZIMÁTICAS.

### V.2.1. TRATAMIENTOS PREVIOS.

Se estudiaron diferentes tratamientos previos a las cromatografías en columna, pero no dieron un buen resultado. La precipitación con sulfato amónico daba un bajo rendimiento, ya que al ser el amonio un activador de la enzima fue necesario dializar con lo que se perdía prácticamente toda la actividad. Los tratamientos con sulfato de protamina y polietilenglicol daban un escaso rendimiento en comparación con el factor de purificación alcanzado (47% y 1,2 respectivamente).

Con el tratamiento térmico se mejoraba la purificación dos veces pero el rendimiento era sólo del 65%. Por todo lo expuesto, se decidió no utilizar ninguno de estos tratamientos en el proceso de purificación de la enzima.

### V.2.2. CROMATOGRAFÍA DE AFINIDAD (BLUE SEPHAROSE CL-6B).

Fué el primer paso de purificación empleado y se utilizaron los parámetros operatorios descritos en el

apartado II.2.7. El perfil de elución pone de manifiesto dos picos con actividad PFK (Fig. 23.A.). El grado de purificación y el rendimiento se muestran en la tabla XII. Denominamos PFK-M<sub>1</sub> a la actividad enzimática que aparece en primer lugar, que se obtiene con un factor de purificación de dos veces y un rendimiento del 20%, y PFK-M<sub>2</sub> a la que aparece en la elución, con un factor de purificación de 16 veces y un rendimiento del 102%.

Antes de continuar con el proceso de purificación se hicieron diversos experimentos para comprobar que los dos picos obtenidos no eran debidos a artefactos introducidos en la cromatografía como pudieran ser: una sobrecarga de la columna, proteólisis de una misma proteína o equilibrio entre dos formas de agregación de la PFK. Se varió la concentración de proteína, que se introdujé en la columna, aumentándola o disminuyéndola, y siempre se obtuvo el mismo perfil con lo que descartamos la posibilidad de sobrecarga. Se emplearon también inhibidores de proteasas, como el EDTA, en los tampones empleados en la purificación y también se obtuvo el mismo perfil. Al recromatografiar cada pico por separado sólo se obtenía un pico y eluía en el mismo lugar donde salía la primera vez, esto elimina la posibilidad de un equilibrio de diferentes estados de agregación.

#### V.2.3. CROMATOGRAFÍA DE FILTRACIÓN EN GEL (SUPEROSÉ 12).

Las fracciones de máxima actividad de ambas formas enzimáticas por separado se sometieron a un segundo proceso cromatográfico en un FPLC (equipo de cromatografía en fase líquida para separación rápida de proteínas), según se describe en el apartado II.2.7. En cada caso sólo se puso de manifiesto un pico de actividad (Fig 23B y C), alcanzandose un factor de purificación y un rendimiento para la PFK-M<sub>1</sub> del 22 y

12% respectivamente y para la PFK-M<sub>2</sub> del 323 y 100%.  
(Tabla XIII).

Tabla XII.- Resumen del proceso de purificación de la PFK.

Tratamiento	Actividad (UI/ml)	proteínas (mg/ml)	A.E.E. (UI/mg)	Factor de purificación	(%) rendimiento
Extracto crudo	$4,5 \times 10^{-1}$	2,52	0,17	---	100
Blue Sepharose CL6B					
PFK-M <sub>1</sub>	$1,8 \times 10^{-2}$	$5,5 \times 10^{-2}$	0,32	2	20
PFK-M <sub>2</sub>	$13,5 \times 10^{-2}$	$5,1 \times 10^{-2}$	2,65	16	102
Superose 12 (FPLC)					
PFK-M <sub>1</sub>	$7,2 \times 10^{-3}$	$2,0 \times 10^{-3}$	3,6	22	12
PFK-M <sub>2</sub>	$8,5 \times 10^{-2}$	$1,5 \times 10^{-3}$	54,8	323	100



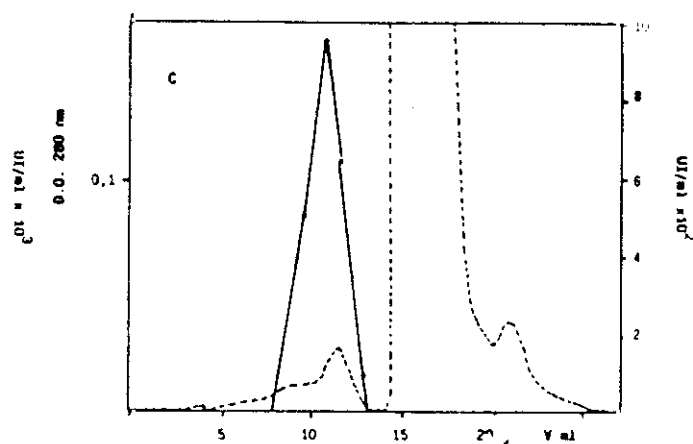
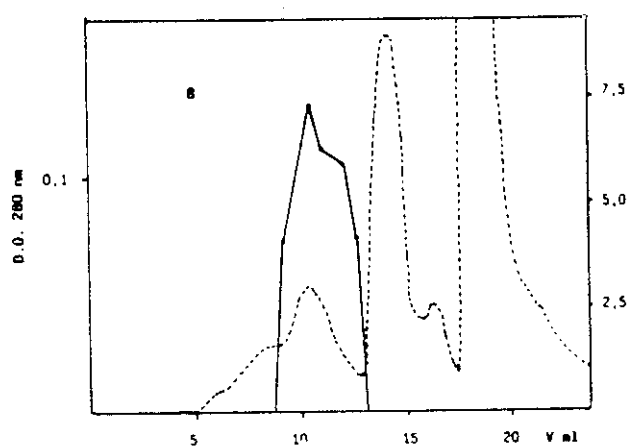
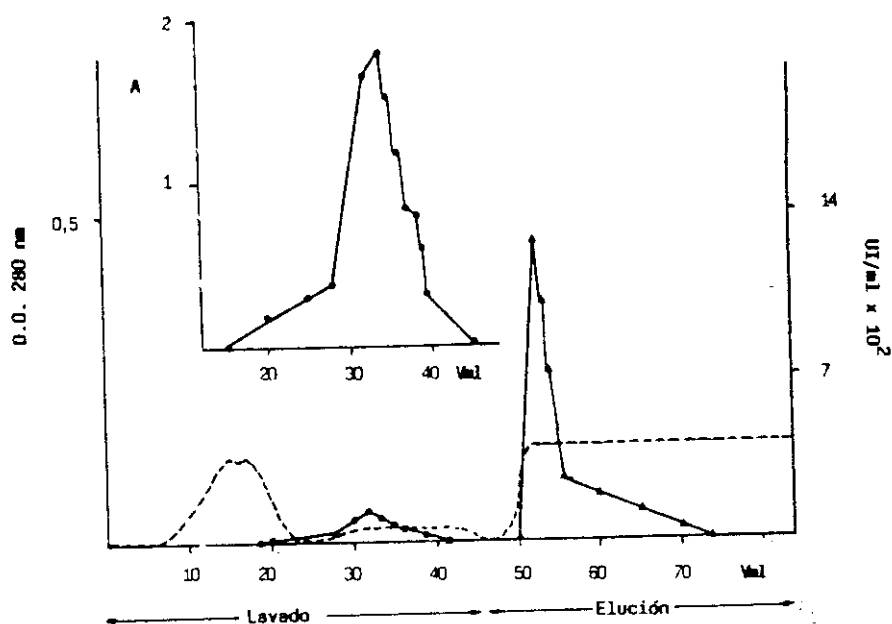


Figura 23.- Perfiles de elución de la purificación de fosfofructoquinasa, (—actividad enzimática y -- concentración de proteína).

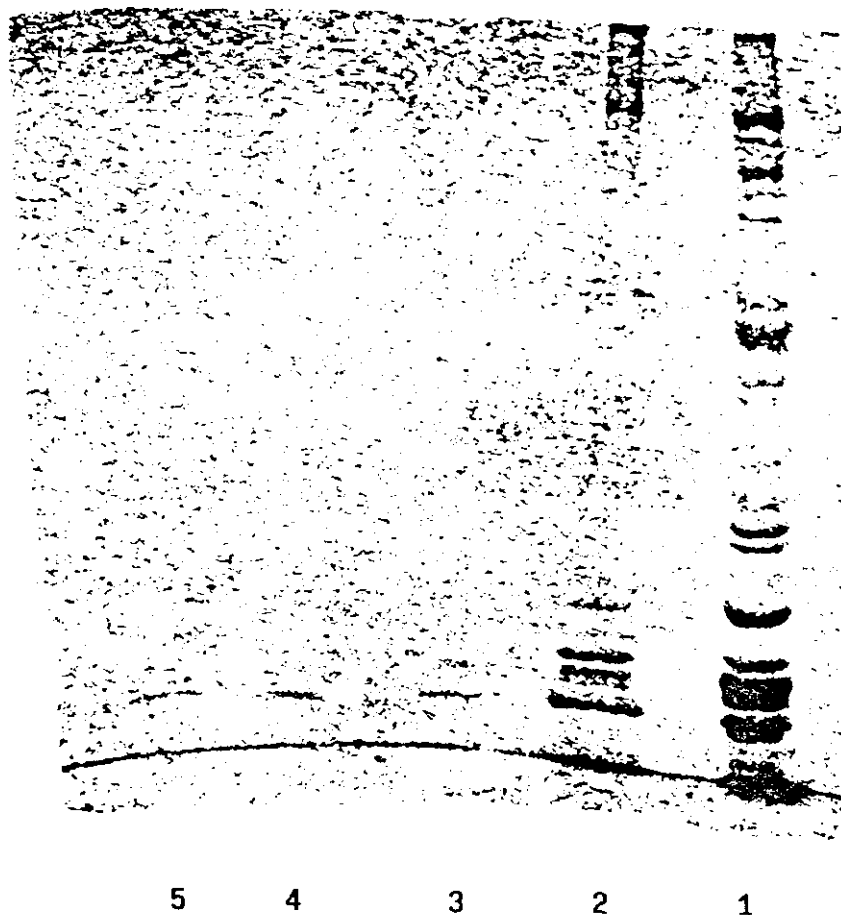
A.- Cromatografía de afinidad, Blue Sepharose CL-6B.

B.- Cromatografía de filtración en gel, FPLC, Fracciones de lavado con actividad.

C.- Cromatografía de filtración en gel, FPLC, Fracciones de elución con actividad.

#### V.2.4. ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA.

Se realizó según se describe en el apartado II.2.8., utilizando como muestras tanto el extracto crudo, como los extractos procedentes de los diferentes pasos de la purificación. La fotografía 2 corresponde a una muestra del último paso del proceso de purificación donde se observa una sola banda.



Fotografía 2.- Desarrollo electroforético en gel de poliacrilamida de la fosfofructoquinasa

- 1.- Extracto crudo,
- 2.- PFK-M<sub>1</sub> procedente de la cromatografía de afinidad,
- 3.- PFK-M<sub>2</sub> procedente de la cromatografía de afinidad,
- 4.- PFK-M<sub>1</sub> procedente de la filtración en gel,
- 5.- PFK-M<sub>2</sub> procedente de la filtración en gel,

#### V.2.5. DETERMINACIÓN DEL PESO MOLECULAR.

La determinación del peso molecular de la fosfofructoquinasa de músculo de lubina se llevó a cabo mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en gradiente del 5 al 15%, según el método descrito en el apartado II.2.9.A. Al interpolar el  $R_f$  de la PFK, ese obtiene un valor para las subunidades de  $73.500 \pm 3.500$  daltons (Figura 24).

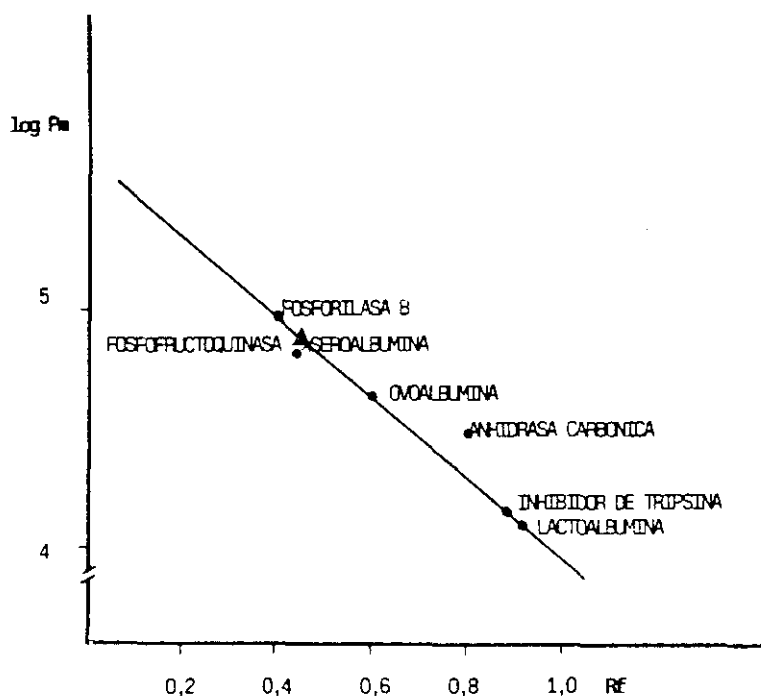


Figura 24.- Curva patrón para la determinación de la masa molecular de la PFK de músculo de lubina mediante electroforesis en gel.

Proteínas patrón: fosforilasa b (94.000), seroalbúmina bovina (67.000), ovoalbúmina (43.000), anhidrasa carbónica (30.000), inhibidor de tripsina (20.000) y  $\alpha$ -lactoalbúmina (14.000).

### V.3. ESTUDIO CINÉTICO DE LAS FORMAS DE LA ENZIMA.

#### V.3.1. COMPORTAMIENTO RESPECTO A SUS SUSTRATOS.

##### A.- Fructosa 6 fosfato.

El efecto de la concentración de la F6P sobre la actividad es diferente en ambas formas enzimáticas. La PFK-M<sub>1</sub> (figura 25A) presenta cooperatividad positiva con un coeficiente de Hill de  $1,28 \pm 0,17$  y una constante de afinidad de  $0,19 \pm 0,03$  mM. Sin embargo, la PFK-M<sub>2</sub> presenta una cooperatividad negativa con un coeficiente de Hill de  $0,75 \pm 0,1$  y una mayor afinidad hacia el sustrato ( $S_{0,5} = 0,06 \pm 0,02$  mM). Se puede observar que cada una de estas formas presenta unos parámetros cinéticos que se asemejan a los dos tramos que se observaban en la curva de saturación por F6P en extracto crudo.

Por otra parte la PFK-M<sub>2</sub> tiene una actividad aproximadamente diez veces mayor que la PFK-M<sub>1</sub>; como la elución se realiza con 5 mM de ADP y este compuesto se ha descrito como un efector positivo de esta enzima, se realizaron experimentos paralelos con PFK-M<sub>1</sub> en presencia de ADP (5 mM) con el fin de comprobar que la PFK-M<sub>2</sub> no corresponde a la misma forma enzimática enmascarada por el efecto activador del ADP. Los resultados se muestran en la figura 26, donde se puede ver que el ADP produce una activación pero sin llegar a incrementar en diez veces la actividad y sin variar los parámetros cinéticos de la PFK-M<sub>1</sub> ( $h = 1,29 \pm 0,12$  y  $S_{0,5} = 0,17 \pm 0,02$  mM).

También se realizaron experimentos para comprobar si la cinética de tipo bifásico que presentaba la enzima en extracto crudo se debía a la mezcla de estas formas

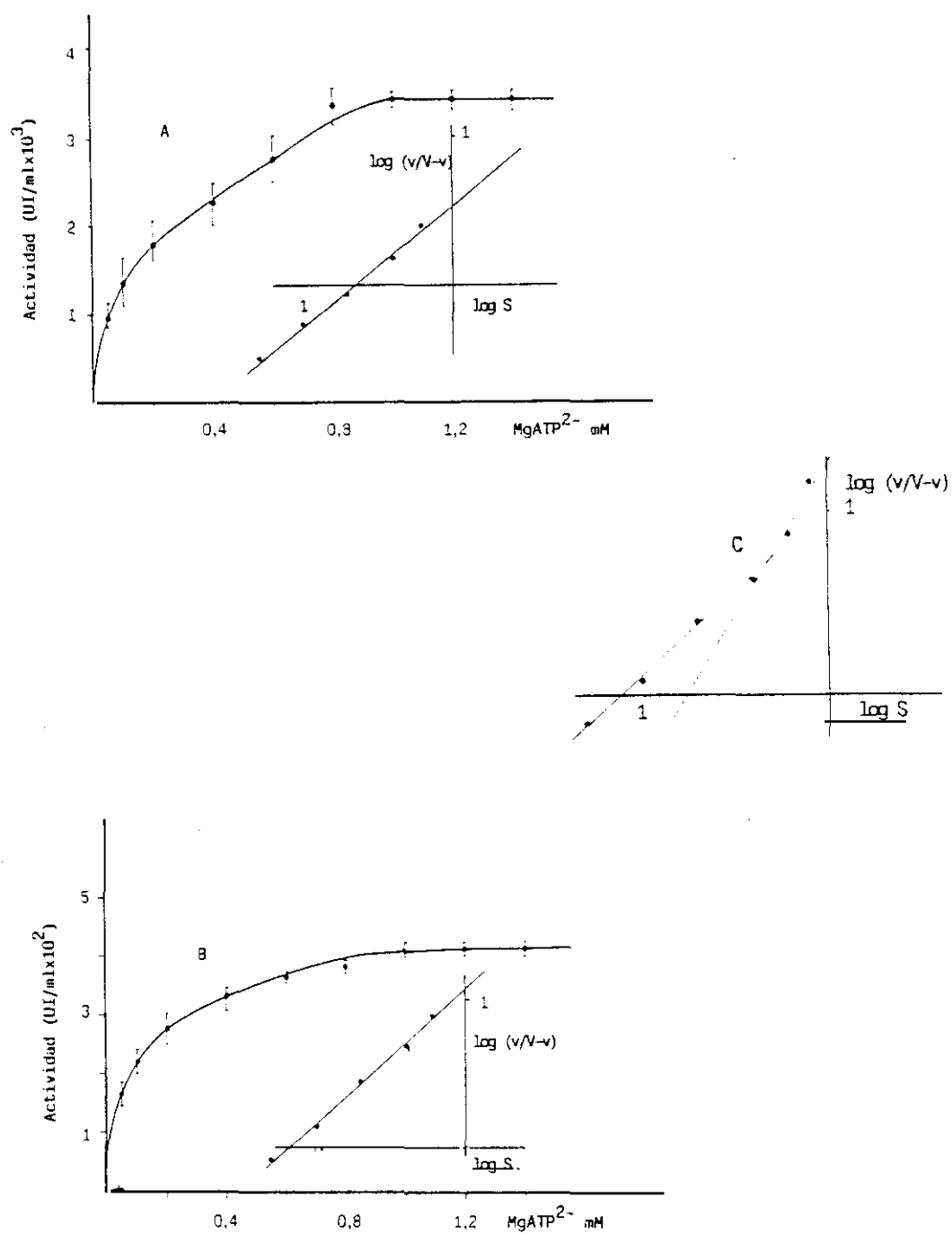


Figura 27.- Efecto de la concentración de  $\text{MgATP}^{2-}$  sobre la actividad PFK.

Representación de Hill inserta.

A, - PFK- $\text{M}_1$ .

B, - PFK- $\text{M}_2$ .

C, - PFK- $\text{M}_1$  + PFK- $\text{M}_2$ .

### B.- Complejo MgATP.

Las curvas de saturación por  $\text{MgATP}^{2-}$  para las dos formas enzimáticas se muestran en la figura 27. Al igual que para el otro sustrato el comportamiento cinético de ambas formas enzimáticas es diferente. La PFK-M<sub>1</sub> tiene cooperatividad negativa con un coeficiente de Hill de  $0,8 \pm 0,06$  y una baja afinidad ( $S_{0,5} = 0,24 \pm 0,05 \text{ mM}$ ). La PFK-M<sub>2</sub> tiene cinética michaeliana ( $h = 0,99 \pm 0,08$ ) y una alta afinidad ( $S_{0,5} = 0,09 \pm 0,01 \text{ mM}$ ).

El ADP sobre la PFK-M<sub>1</sub>, respecto a este sustrato, muestra también efecto activador (figura 28) y modifica los parámetros cinéticos pero sin igualarlos a los de la PFK-M<sub>2</sub> (Tabla XIII).

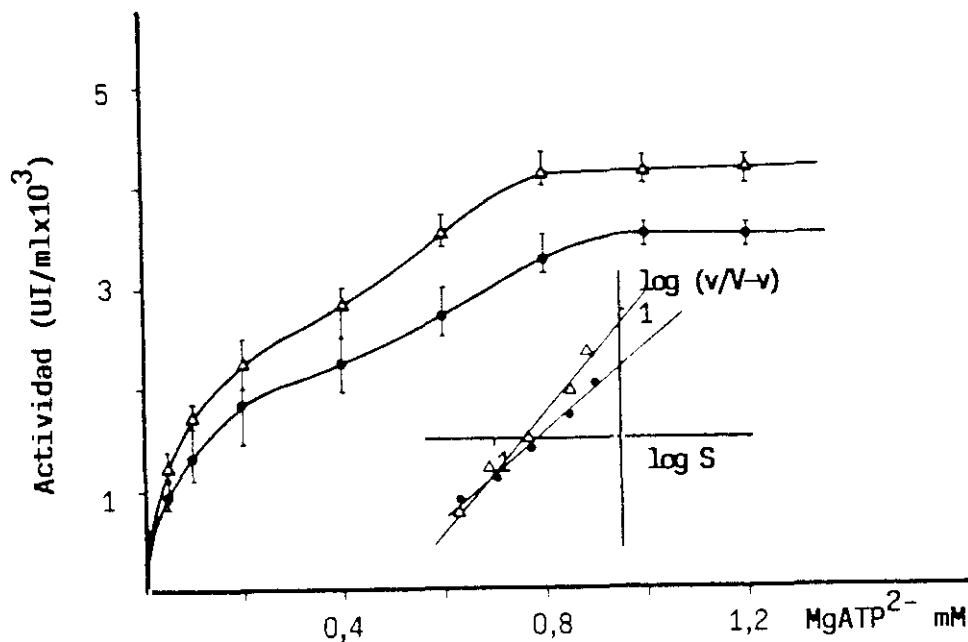


Figura 28.- Efecto del ADP sobre el comportamiento cinético de PFK-M<sub>1</sub> respecto al  $\text{MgATP}^{2-}$ .

Representación de Hill inserta,

● Control,

△ + ADP 5 mM,

El efecto conjunto de ambas formas enzimáticas (Fig. 27C) manifiesta una cinética de tipo bifásico al igual que sucedía con el otro sustrato, F6P, con parámetros cinéticos muy semejantes al extracto crudo (Tabla XIII).

En la tabla XII se resumen los parámetros cinéticos de la PFK de músculo de lubina, para sus dos formas enzimáticas y para sus dos sustratos.

Tabla XIII.- Parámetros cinéticos de la PFK respecto a sus sustratos F6P y  $\text{MgATP}^{2-}$ .

	F6P		MgATP <sup>2-</sup>	
	h	S <sub>0.5</sub>	h	S <sub>0.5</sub>
Extracto crudo 0-0,3 mM	0,96±0,26	0,12±0,04	0,71±0,08	0,12±0,03
0,3-1 mM	2,36±0,15	0,28±0,02	1,50±0,20	0,23±0,05
PFK-M <sub>1</sub>	1,28±0,17	0,19±0,03	0,80±0,06	0,24±0,05
PFK-M <sub>2</sub>	0,75±0,10	0,06±0,02	0,99±0,08	0,09±0,01
PFK-M <sub>1</sub> + ADP 5mM	1,29±0,12	0,17±0,02	1,06±0,06	0,15±0,09
PFK (M <sub>1</sub> + M <sub>2</sub> ) 0-0,4 mM	0,94±0,08	0,16±0,03	0,91±0,06	0,09±0,02
0,4-1 mM	2,80±0,13	0,28±0,02	1,60±0,10	0,18±0,04

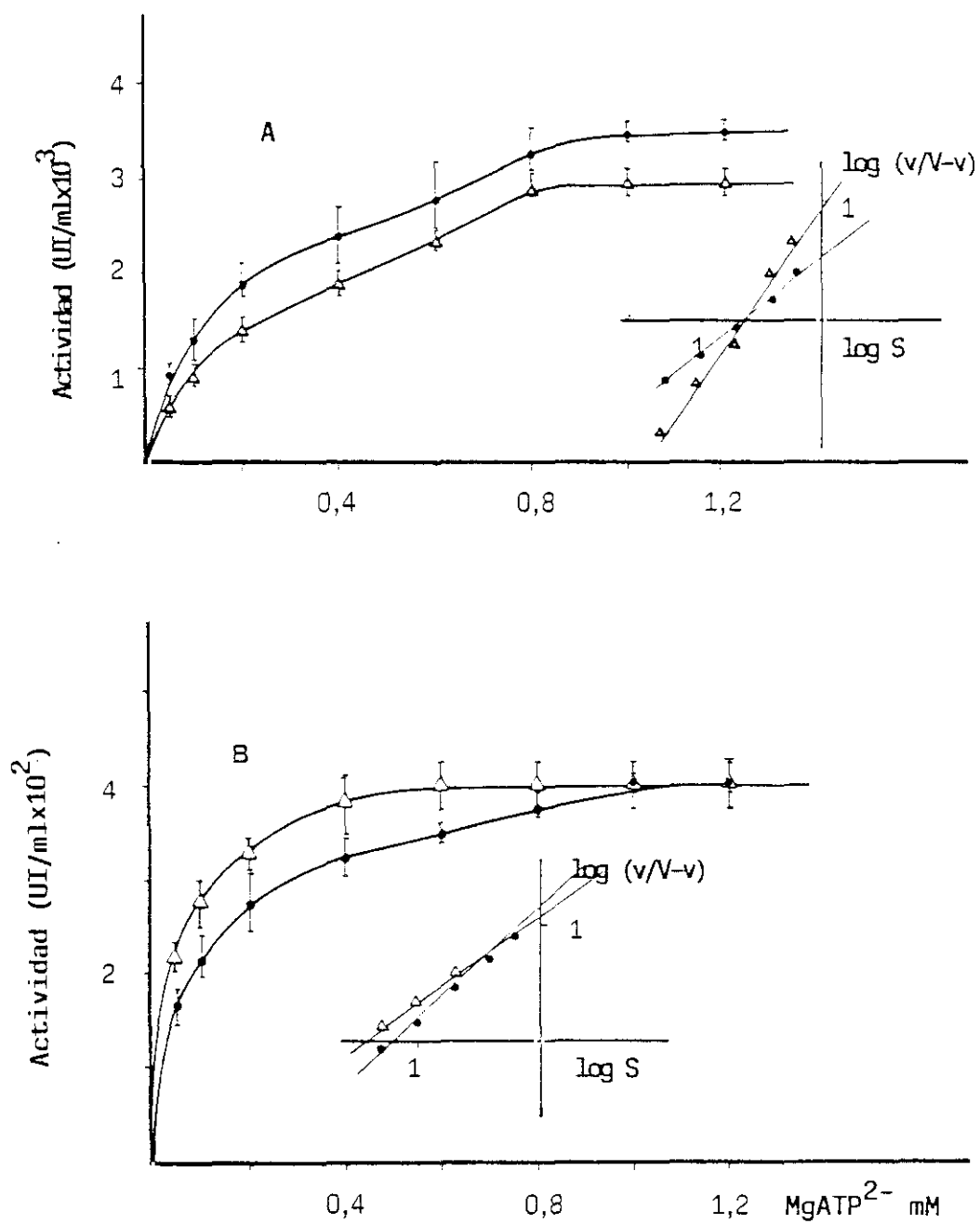


Figura 23.- Efecto del Mg<sup>2+</sup> libre (2,5 mM) sobre la actividad PFK respecto al MgATP<sup>2-</sup> sobre la PFK-M<sub>1</sub> (A) y la PFK-M<sub>2</sub> (B).

● Control.

△ + Mg<sup>2+</sup> 2,5 mM.



#### V.4.2. COMPLEJO $\text{MgATP}^{2-}$ Y SU RELACIÓN CON $\text{Mg}^{2+}$ Y $\text{ATP}^{4-}$ LIBRES.

##### A.- Efecto del $\text{Mg}^{2+}$ libre.

Se estudió el efecto del  $\text{Mg}^{2+}$  sobre ambas formas enzimáticas, a una concentración fija de 2,5 mM al igual que se realizó en el extracto crudo. Los resultados se muestran en la figura 29.

Sobre la PFK- $\text{M}_1$  (figura 29A) se comporta como inhibidor, disminuye la  $V_{\text{max}}$ , incrementa la cooperatividad transformándola en positiva ( $h = 1,44 \pm 0,09$ ) y no modifica la afinidad.

Sobre la PFK- $\text{M}_2$  (figura 29B) actúa como activador aunque no aumenta la  $V_{\text{max}}$ , hace la cooperatividad negativa ( $h = 0,72 \pm 0,1$ ) y aumenta la afinidad ( $S_{0,5} = 0,06 \pm 0,007$  mM)

Sobre el conjunto de PFK- $\text{M}_1$  y PFK- $\text{M}_2$ , el  $\text{Mg}^{2+}$  hace que no se manifieste la cinética bifásica, como se puede observar en la figura 30, efecto que también se observaba en extracto crudo. La cinética es hiperbólica con una  $K_m$  de  $0,06 \pm 0,01$  mM.

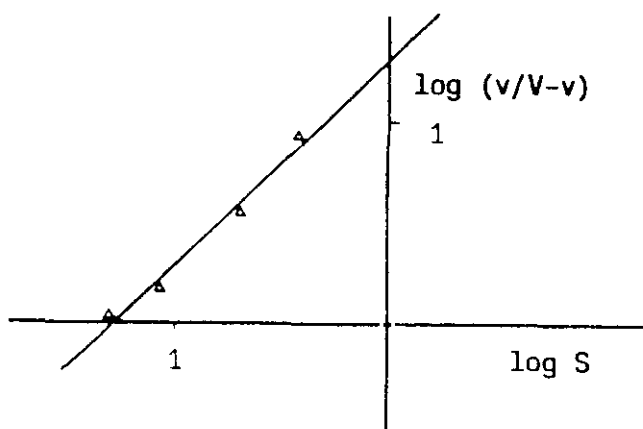


Figura 30.- Representación de Hill del efecto del  $\text{Mg}^{2+}$  sobre la actividad PFK ( $\text{M}_1 + \text{M}_2$ ) respecto al  $\text{MgATP}^{2-}$ .

### B.- Inhibición por $\text{ATP}^{4-}$ libre.

En la figura 33 se muestra el efecto del  $\text{ATP}^{4-}$  sobre la actividad de ambas formas de fosfofructoquinasa purificada. En la figura 33A se observa que la constante de inhibición para la PFK- $\text{M}_1$  es de 1,8 mM, semejante a la correspondiente a los puntos altos de la curva de saturación del extracto crudo y en la figura 33B se ve que para la otra forma la  $K_i$  es de 3,75 mM semejante a la zona de bajas concentraciones. En ambas formas enzimáticas la inhibición es competitiva total.

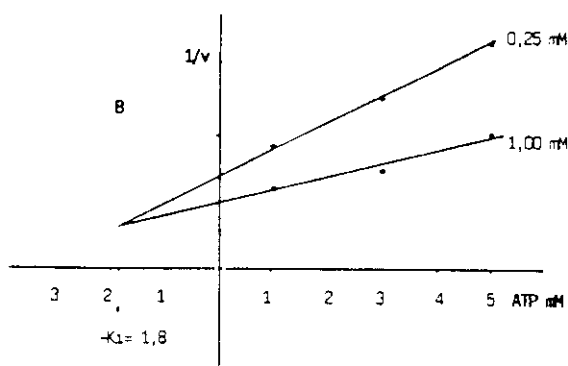
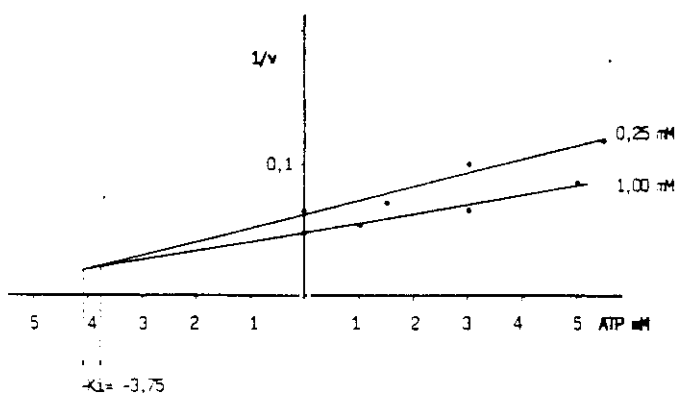


Figura 31.- Tipo de inhibición del  $\text{ATP}^{4-}$  respecto al  $\text{MgATP}^{2-}$ .

A.- PFK- $\text{M}_1$ .

B.- PFK- $\text{M}_2$ .

El porcentaje de inhibición por ATP es semejante en ambas formas enzimáticas como se refleja en la tabla XIV. El 50% de inhibición, sobre la PFK- $\text{M}_1$ , se alcanza

con 5 mM de ATP, como ocurría en el extracto crudo, pero a la concentración más próxima a la intracelular la inhibición es mayor que en crudo. La PFK-M<sub>2</sub> tiene un porcentaje de inhibición algo más bajo que la anterior para todas las concentraciones de ATP<sup>4-</sup> libre estudiadas. Curiosamente, puede observarse que los valores medios de los porcentajes de inhibición de ambas formas enzimáticas es semejante a los valores de inhibición encontrados para la enzima sin purificar.

Tabla XIV.- Porcentaje de inhibición (%) de la actividad PFK por ATP<sup>4-</sup> libre respecto al Mg<sup>2+</sup>.

[ATP <sup>4-</sup> ] libre	PFK-M <sub>1</sub>		PFK-M <sub>2</sub>	
	1 mM	0,25 mM	1 mM	0,25 mM
5,00 mM	50 ± 1	41 ± 10	42 ± 2	45 ± 3
2,75 mM	39 ± 1	33 ± 3	26 ± 5	35 ± 2
1,00 mM	24 ± 11	12 ± 1	7 ± 1	8 ± 1

#### V.4.3. MODULADORES.

##### A.- Estudio de los diferentes efectores.

La fosfofructoquinasa está descrita como una enzima alostérica capaz de responder a una serie de metabolitos, tal como se describió en el apartado II.6. Con objeto de caracterizar las propiedades reguladoras de la enzima en músculo de lubina y compararlas con la de otros orígenes, hemos estudiado el efecto que pudieran tener los moduladores citados en el apartado V.1.3., sobre la actividad de la fosfofructoquinasa

purificada, respecto a la F6P en diferentes puntos de la curva de saturación.

Todos los resultados que se describen a continuación corresponden a experimentos realizados a pH 8, temperatura de 22° C y respecto a la F6P, que se considera el sustrato más específico de la enzima. Los resultados obtenidos se reflejan en la tabla XV.

En la tabla XV se pueden observar las diferencias tanto cuantitativas como cualitativas de ambas formas enzimáticas frente a sus efectores.

Tabla XV.- Influencia de diversos efectores sobre la actividad PFK respecto a F6P,  $[MgATP^{2-}] = 3mM$ .  
N.E. no efecto.

Efactor (mM)	PFK-M <sub>1</sub>		PFK-M <sub>2</sub>	
	F6P 0,8 mM	F6P 0,25 mM	F6P 1 mM	F6P 0,15 mM
Control	100	100	100	100
ADP (0,445)	146,0 ± 5,0	125,0 ± 5,6	---	---
Citrato (1,8)	N.E.	N.E.	8,2 ± 3,0	N.E.
NH <sub>4</sub> <sup>+</sup> (3,0)	N.E.	N.E.	120,0 ± 10,0	114,0 ± 9,0
ATP <sup>4-</sup> (5,0)	50,0 ± 2,0	67,0 ± 5,0	56,5 ± 4,6	16,8 ± 6,0
(3,0)	61,5 ± 1,5	75,0 ± 4,2	74,3 ± 2,8	55,6 ± 3,2
PEP (0,057)	N.E.	N.E.	143,3 ± 3,8	131,0 ± 18,0
G-1,6-P <sub>2</sub> (0,1)	144,0 ± 19,0	138,0 ± 12,0	123,0 ± 5,8	123,0 ± 10,0
F-1,6-P <sub>2</sub> (0,01)	200,0 ± 12,0	200,0 ± 12,0	650,0 ± 18,6	660,0 ± 18,0
F-2,6-P <sub>2</sub> (0,3 mM)	135,5 ± 10,8	141,0 ± 3,0	117,0 ± 6,0	125,5 ± 11,0
F-2,6-P <sub>2</sub> + G-1,6-P <sub>2</sub>	136,8 ± 3,5	148,7 ± 2,3	135,8 ± 4,2	141,0 ± 3,5

Para determinar la influencia de la F-1,6-P<sub>2</sub> se siguió el método descrito en el apartado II.2.3. Debido

a la utilización de este método no se pudo medir el efecto de la F-1,6-P<sub>2</sub> junto al de la G-1,6-P<sub>2</sub> y de la F-2,6-P<sub>2</sub>, ya que no se detectaba activación por estos últimos compuestos con este procedimiento.

Al estudiar el efecto conjunto de la G-1,6-P<sub>2</sub> y la F-2,6-P<sub>2</sub> sobre la PFK-M<sub>1</sub> se observa, independientemente del orden en que se añadan, que el porcentaje de activación corresponde a la primera que se añade y la otra no es capaz de modificar este efecto. Sin embargo sobre la PFK-M<sub>2</sub> los efectos son aditivos.

Además de los metabolitos y concentraciones que se muestran en la tabla XV, se probaron otros que se citan a continuación: ADP, a concentraciones mas bajas que la fisiológica (0,2 mM) y a la concentración empleada en la elución (5mM) obteniéndose el mismo porcentaje de activación sobre la PFK-M<sub>1</sub> y ningún efecto sobre PFK-M<sub>2</sub>; fenilalanina, descrito como inhibidor de PK, a concentración intracelular y más elevada (1 mM), no afecta a la PFK-M<sub>1</sub> y sobre la otra forma enzimática se observo una ligera inhibición (11%) pero no a todas las concentraciones de sustrato; asimismo, la alanina a concentraciones de 1 y 2 mM, el citrato a concentración intracelular y la fosfocreatina a concentraciones fisiológicas, no manifestaron influencia alguna.

A la vista de estos resultados, se procedió a caracterizar cinéticamente el efecto de la F-1,6-P<sub>2</sub> como activador más potente y el efecto de la F-2,6-P<sub>2</sub> como efector más característico de la enzima. Así mismo, se estudió también el efecto del PEP, ya que está descrito como un inhibidor de esta enzima y en nuestro caso (PFK-M<sub>2</sub>), al igual que en hígado de lubina (Fideu y col., 1989), se comporta como un activador.

### B.- Efecto de la fructosa 1,6 bifosfato.

En la figura 32 se muestra la influencia de este activador sobre el comportamiento cinético de ambas formas enzimáticas. La F-1,6-P<sub>2</sub> actúa sobre la PFK-M<sub>1</sub>, básicamente, disminuyendo el coeficiente de Hill ( $h = 1,07 \pm 0,06$ ) hasta hacer la cinética hiperbólica, aumentando solo ligeramente la afinidad ( $S_{0,5} = 0,15 \pm 0,005$  mM) (figura 32A).

Sobre la PFK-M<sub>2</sub>, la F-1,6-P<sub>2</sub> actúa también como activador pero mucho más potente. Varía muy poco el coeficiente de Hill, haciendo algo más negativa la cooperatividad ( $h = 0,62 \pm 0,089$ ) y aumenta la afinidad ( $S_{0,5} = 0,03 \pm 0,009$  mM) (figura 34B).

### C.- Efecto de la fructosa 2,6 bifosfato.

En la figura 33 se muestra el efecto producido por la F-2,6-P<sub>2</sub> sobre el comportamiento cinético de ambas formas enzimáticas. Se comporta como un activador pero menos potente que la F-1,6-P<sub>2</sub>. La F-2,6-P<sub>2</sub> actúa sobre la PFK-M<sub>1</sub> incrementando la Vmax pero sin variar los parámetros cinéticos (Figura 33A).

Por otra parte, sobre la PFK-M<sub>2</sub> (figura 33B) incrementa la Vmax, aunque en menor porcentaje que para la PFK-M<sub>1</sub>, disminuye el coeficiente de Hill ( $h = 0,6 \pm 0,03$ ) y aumenta la afinidad ( $S_{0,5} = 0,04 \pm 0,01$  mM); como se puede observar en la figura 33B.

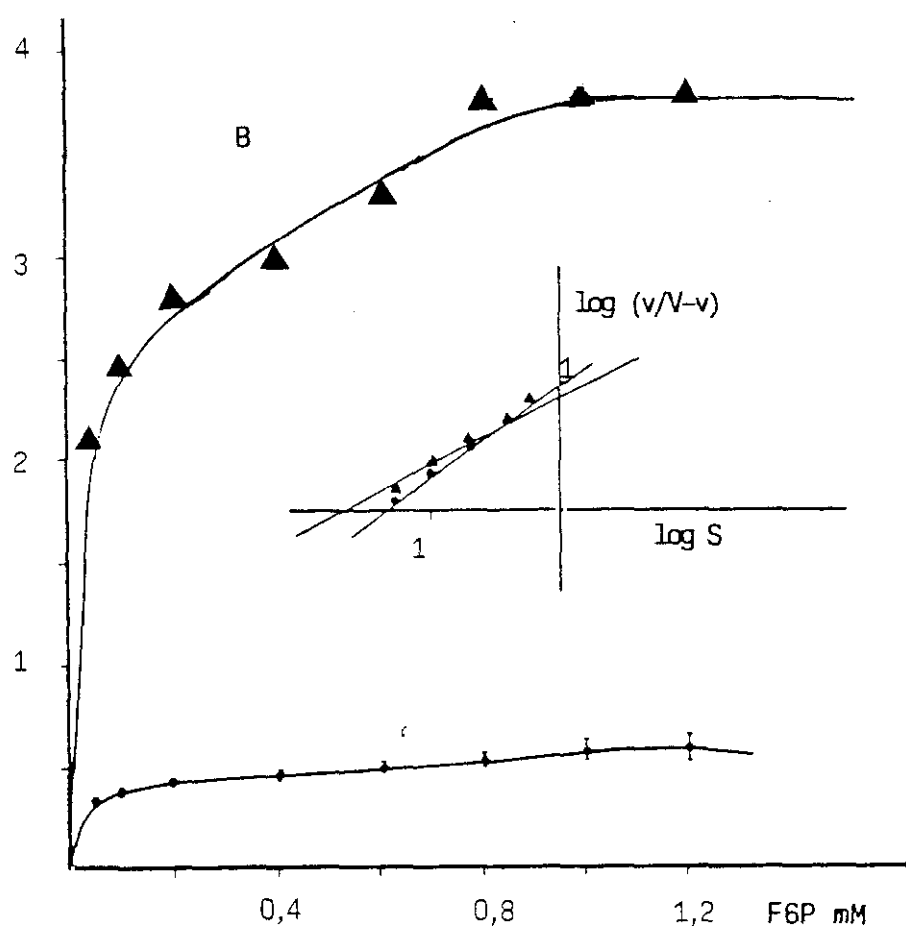
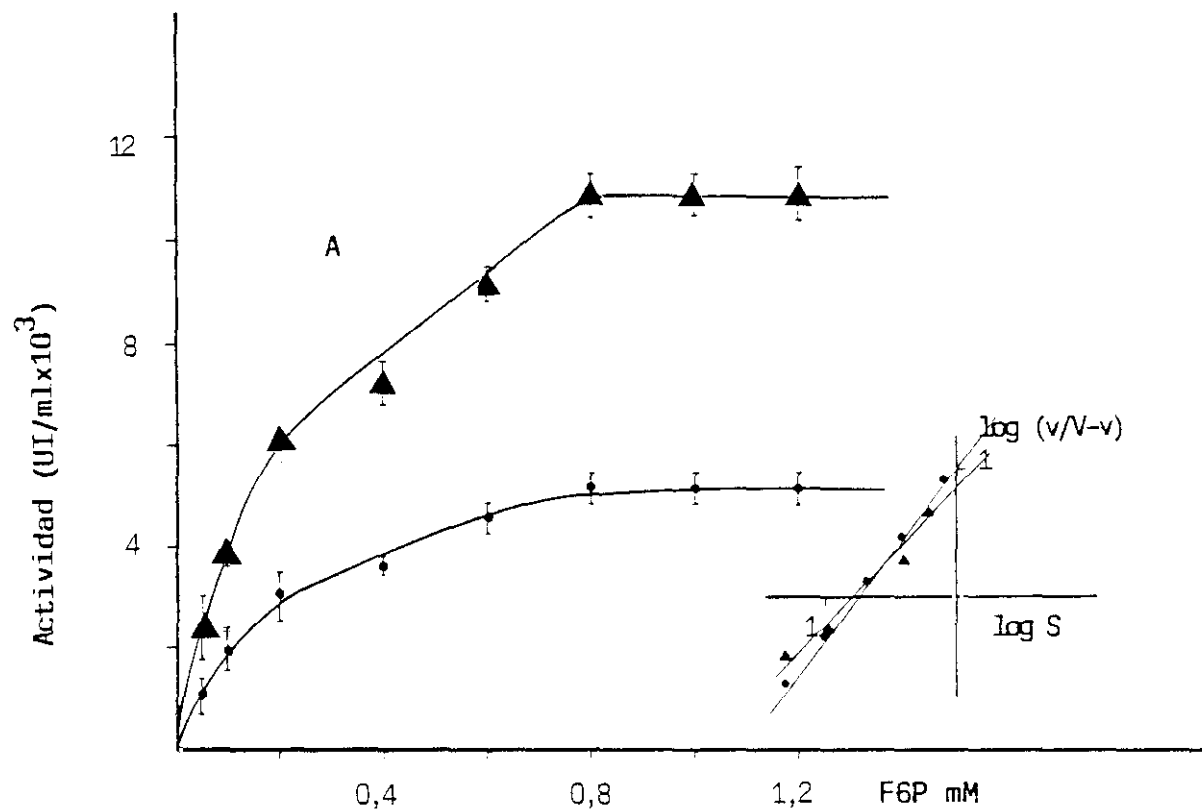


Figura 32.-Efecto de la F-1,6-P<sub>2</sub> sobre la actividad (A) PFK-M<sub>1</sub> y (B) PFK-M<sub>2</sub> respecto a F6P.  
Representación de Hill inserta.

- Control,
- ▲ F-1,6-P<sub>2</sub> (0,01 mM).

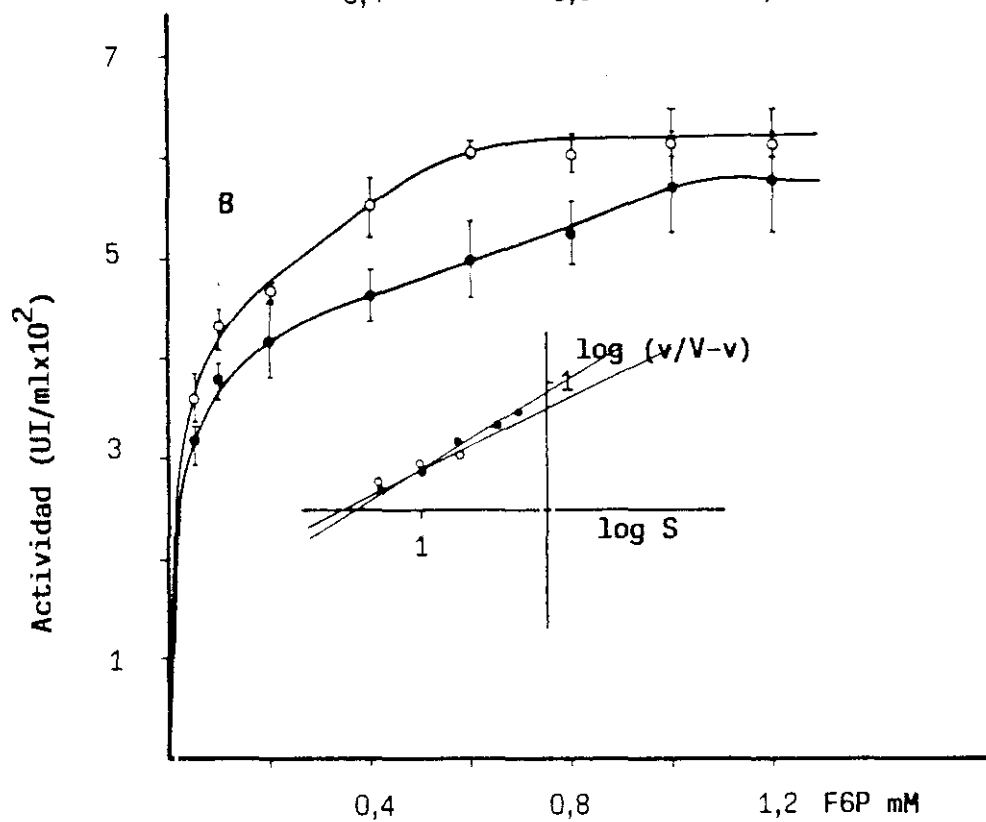
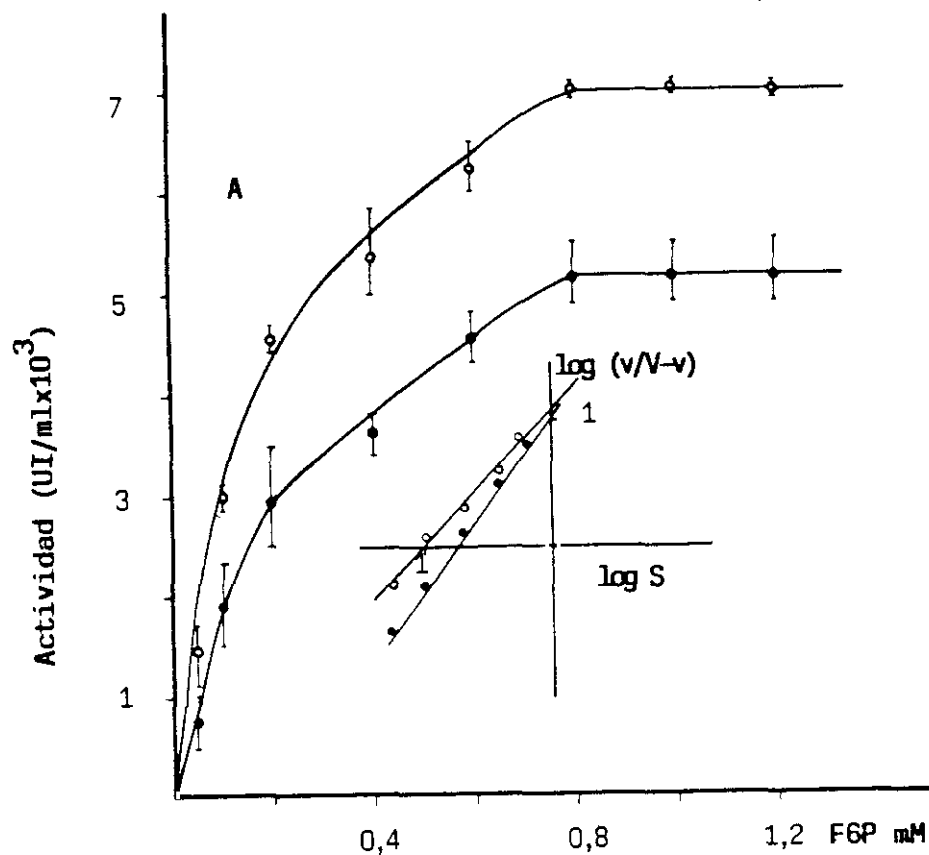


Figura 33.- Efecto de la F-2,6-P<sub>2</sub> sobre la actividad (A) PFK-M<sub>1</sub> y (B) PFK-M<sub>2</sub>.  
Representación de Hill inserta.

● Control.

○+ F-2,6-P<sub>2</sub> (0,3 mM).



#### D.- Efecto del fosfoenolpiruvato.

El PEP no manifiesta efecto alguno sobre PFK-M<sub>1</sub> y actúa como un activador sobre la PFK-M<sub>2</sub> (figura 34), modificando la V<sub>max</sub> pero sin alterar demasiado los parámetros cinéticos. Disminuye el coeficiente de Hill ( $h = 0,67 \pm 0,04$ ) y la afinidad ( $S_{0,5} = 0,076 \pm 0,06$  mM).

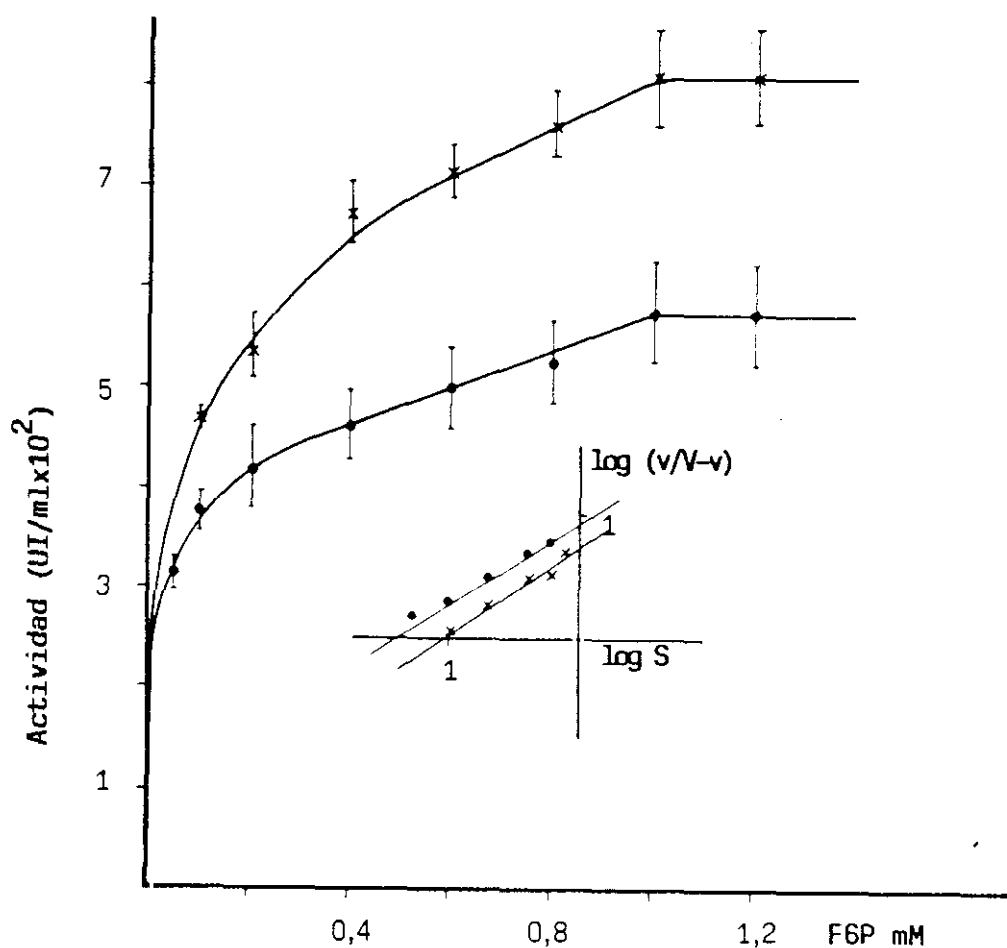


Figura 34.- Efecto del PEP sobre la actividad PFK-M<sub>2</sub>. Representación de Hill inserta.

● Control.

\* + PEP  $5,7 \times 10^{-2}$  mM.

DISCUSIÓN.

## VI. DISCUSIÓN.

### VI.1. DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN INTRACELULAR DE METABOLITOS.

Una posibilidad de obtener mayor información de la actividad "in vivo" de las enzimas y del metabolismo energético de los seres vivos es la estimación de la concentración intracelular de los intermediarios metabólicos y de los nucleótidos de adenina (Leray y Bachand, 1975). El estudio de las concentraciones fisiológicas de los compuestos relacionados con la ruta glicolítica es un paso inicial para poder conocer mejor el funcionamiento de la citada ruta.

Los nucleotidos de adenina tienen un interés particular porque la energía metabólica es preferentemente transferida a través de los enlaces ricos en energía del ATP (Cann-Moisán, 1989). La determinación del ATP, así como la del ADP y AMP (productos de la hidrólisis del ATP), nos dará información sobre la energía disponible de la célula.

Los cambios en los niveles de efectores debidos a las diferentes situaciones metabólicas podría indicar si una enzima es regulada o no por factores diferentes a la concentración de sustrato y es fundamental en el estudio de la regulación de una enzima, el conocimiento intracelular de sustratos y efectores.

Las concentraciones fisiológicas de metabolitos de especies ectotermas pueden variar con la temperatura del hábitat (Freed, 1971). Los valores encontrados en nuestro caso, según se refleja en el apartado III.1, para lubinas cuya temperatura media de cultivo era de 15°C, son del orden de los que podrían obtenerse

interpolando entre los obtenidos por Freed (1971) en músculo de carpa (*Carassius auratus*) aclimatadas a 5 y 25°C. Los valores obtenidos (Tabla I y II) no muestran marcadas diferencias con los encontrados por diversos autores para músculo de diferentes especies acuáticas (Diezdridzik y Hochachka, 1978; Dobson y Hochachka, 1987; Dobson y col., 1987; Cann-Mosian y col., 1989).

El valor de 0,84 encontrado para la carga energética celular, se encuentra comprendido entre los niveles normales de la mayoría de los organismos (Atkinson y Walton, 1967; Cann-Mosian, 1989). Los valores de carga energética varían entre cero (todos los nucleótidos están en forma de AMP) y uno (todos los nucleótidos están en forma de ATP). El alto valor encontrado por nosotros indica que las concentraciones de ATP son elevadas, lo que puede estar justificado por la función de este tejido, y es similar a los niveles encontrados en otros músculos de peces (Leaver y Burt, 1981). Asimismo la concentración de fosfocreatina es también muy elevada.

La actividad PFK y su papel regulador en la ruta glicolítica, se ve influida por la concentración de sustrato y producto de la reacción. De acuerdo con Bosca y Corredor (1984), las células se clasifican en dos grupos, teniendo en cuenta que la  $K_m$  de la aldolasa es del orden micromolar, dependiendo del cociente  $F6P/F-1,6-P_2$ : Tipo I, aquellas células donde la relación es superior a 1 y tipo II, aquellas en que es inferior a 0,1. En las del tipo II la ruta estaría regulada en una etapa posterior a la PFK y en las de tipo I, a la que pertenecería el músculo blanco de lubina, cuya relación  $F6P/F-1,6-P_2$  es 2,13, la reacción catalizada por la PFK sería la etapa limitante de la glicolisis (Fell, 1984;

Racker, 1984; Akkerman, 1985; Crabtree, 1985; Masters, 1985).

Se han observado diferencias significativas en los valores determinados para músculo con los encontrados para hígado de esta misma especie (Medina, 1986), lo cual es lógico debido a la diferente función fisiológica de estos dos órganos. En general, todas las concentraciones de intermediarios de la ruta glicolítica son, al menos, el doble en músculo que en hígado, lo que indica que en peces, el músculo blanco es un tejido con una gran actividad glicolítica.

## VI.2. PIRUVATOQUINASA.

Como ha sido citado anteriormente, el músculo blanco de teleósteos es, fundamentalmente, glicolítico y es en este tejido de lubina donde se ha observado una mayor actividad específica de esta enzima. Por ello hemos realizado la purificación y el estudio de diferentes propiedades cinéticas y reguladoras de la piruvatoquinasa de músculo blanco de lubina.

Previo al proceso de purificación se realizaron experimentos con extracto crudo que nos llevaron a determinar el pH óptimo (7,4); la energía de activación (27 KJ/mol) y el  $Q_{10}$  ( $1,4 \pm 0,1$ ) de la enzima. Los valores de estos parámetros son similares a los encontrados para músculo de otras especies de peces (Randall y Anderson, 1975; Johnston, 1975b; Guppy y Hochachka, 1979). El valor de  $E_a$  es menor que los notificados para mamíferos como corresponde a organismos ectotermos, en los que la eficiencia catalítica de las enzimas suele ser superior para contrarrestar las bajas temperaturas de su hábitat (Somero y Hochachka, 1968; Somero y col., 1968).

La purificación de la piruvatoquinasa de músculo blanco de lubina se llevó a cabo mediante tratamiento térmico y cromatográfico (filtración en gel y afinidad). Sólo se ha encontrado un pico con actividad en la elución de ambas cromatografías y su análisis electroforético muestra una sola banda de acuerdo con lo descrito para la mayoría de las piruvatoquinasas y contrariamente a lo encontrado por Sand (1984) que notifica la existencia de formas isoenzimáticas.

Utilizando la técnica de cromatografía con Sephacryl S-300, se ha obtenido un valor del peso

molecular de  $580.000 \pm 20.000$  daltons para la enzima nativa. Los valores dados en la bibliografía para piruvatoquinasas de músculo de organismos acuáticos (Munday y col., 1980; Kayne, 1973; Holwerda y de Zwaan, 1973; Cortesi y col., 1984; Giles, 1976a) indican que normalmente la enzima es un tetramero con subunidades de unos 57.000 daltons aunque en moluscos se han descrito formas triméricas y pentaméricas activas (Giles, 1976b). Algunos autores han postulado también la existencia de un decámero activo (Lin y col., 1989) cuyo peso molecular se correspondería con el hallado para esta PK.

El comportamiento cinético de la enzima purificada varía con respecto al observado en el extracto crudo, ya que aunque la cinética respecto al ADP se mantiene hiperbólica, con respecto al PEP se modifica, mostrando una cinética sigmoidal con disminución de la afinidad. Este comportamiento es similar al observado para la enzima de músculo en otras especies de peces (Moon y Hulbert, 1980a y b; Guderley y Cardenas, 1980a; Roberts y Anderson, 1985; Somero y Hochachka, 1968) y de otros vertebrados inferiores (Munday y col., 1980).

La piruvatoquinasa está descrita como una enzima alostérica fuertemente regulada. En la lubina, al ser un animal ectotermo, tienen gran importancia en el control de su metabolismo, no solo los diferentes moduladores y sus características fisiológicas sino también las alteraciones de las condiciones ambientales, como puede ser un cambio de la temperatura. La piruvatoquinasa de músculo de lubina muestra una cierta termorregulación. La combinación de las variaciones de cooperatividad positiva y afinidad que presenta esta enzima respecto a PEP dentro del intervalo de temperaturas de su hábitat, parecen indicar que se favorece un nivel de funcionamiento estable de esta actividad; hasta 15°C aumenta la

cooperatividad y a partir de aquí hasta 27°C aumenta la afinidad. Este mismo comportamiento se ha descrito para esta enzima en músculo blanco de otras especies de peces (Moon y Hulbert, 1980; Low y Somero, 1976) sin embargo, en músculo rojo e hígado de teleosteos (entre los que se encuentra la lubina) aumenta la afinidad al disminuir la temperatura (Low y Somero, 1976; Fideu y col., 1985). En los peces euritérmicos es esencial que sus funciones permanezcan lo más constante posible dentro de las temperaturas normales del hábitat (Low y Somero, 1976) como parece ocurrir en los diferentes tejidos de lubina, sin embargo, en los peces estenotermos se observan cambios mayores en los parámetros cinéticos frente a la temperatura (Low y Somero, 1976; Somero y Hochachka, 1968).

El cambio de pH del óptimo al pH intracelular (6,8), da lugar a un fuerte aumento de la afinidad respecto al sustrato PEP, lo que puede reflejar el gran potencial anaeróbico de este músculo para resistir severos periodos de hipoxia. Variaciones en el mismo sentido de los valores de los parámetros cinéticos se han observado también en músculo de peces e invertebrados marinos (Michaelidis y Storey, 1990, 1991; Roberts y Anderson, 1985; Plaxton y Storey, 1984; Moon y Hulbert, 1980a y b; Randall y Anderson, 1975; Johnston, 1975b) e incluso en otros órganos de peces (Sand, 1986; Fideu y col., 1986).

La F-1,6-P<sub>2</sub>, activador más característico de la isoenzima mayoritaria en tejido muscular de peces, ejerce su efecto activador sobre la piruvatoquinasa de músculo blanco de lubina, aumentando 2,5 veces la V<sub>max</sub> a concentraciones cercanas a la fisiológica (0,1 mM) y transformando la cinética respecto al PEP de sigmoidal a hiperbólica. El mecanismo feedforward de la F-1,6-P<sub>2</sub> se



puede justificar de acuerdo con Zammit y col. (1978) como una consecuencia de la necesidad de estos organismos de proveerse de energía de forma anaeróbica, debido al bajo aporte de oxígeno que tienen en determinadas condiciones. Este efecto se pierde en los vertebrados superiores por el establecimiento de una circulación sanguínea doble y completa, aunque por otra parte, se ha observado que en la isoenzima K ( $M_2$ ) de mamíferos la F-1,6-P<sub>2</sub> favorece la transformación de monómeros a tetrámeros (Ashizawa y col., 1991). El incremento en la generación de energía anaeróbica, en los peces, puede tener según Johnston (1975a) un significado fisiológico en la adaptación de la actividad locomotora de estos organismos para nadar a gran velocidad, e incluso en la fatiga la activación del flujo glicolítico, sería más necesaria en músculo de peces que en el de mamíferos (Guderley y Cardenas, 1980).

La intensidad de este efecto activador sobre la piruvatoquinasa de músculo de lubina varía con la temperatura, siendo muy poco pronunciado a las que podríamos considerar extremas (5 y 27°C). Sin embargo a las temperaturas normales del habitat llega a aumentar dos o tres veces la velocidad máxima. De esta manera se puede considerar que la enzima es termodependiente en relación con la regulación por F-1,6-P<sub>2</sub>. Por el contrario, las variaciones del coeficiente de Hill y de S<sub>0.5</sub>, son pequeñas e incluso tienden a compensarse, lo cual puede indicar una acción protectora de este activador respecto a las variaciones de temperatura, efecto que también ha sido observado en piruvatoquinasa de lagarto (Torres y col., 1984). No obstante, cabe señalar, que a 5°C, a pesar del escaso aumento producido en la V<sub>max</sub>, su presencia duplica la afinidad respecto al sustrato PEP, ejerciendo asimismo una acción reguladora

que favorecerá el funcionamiento de la actividad enzimática a esta temperatura desfavorable.

La piruvatoquinasa de músculo de lubina también es activada por F-2,6-P<sub>2</sub> de forma similar a la otra hexosa bifosforilada citada anteriormente. Este compuesto es capaz de producir activación a concentración intracelular (0,3 µM), aumentando un 20% la V<sub>max</sub> y al igual que la F-1,6-P<sub>2</sub> no modifica la afinidad por el sustrato PEP. Conviene señalar que el efecto activador de la F-2,6-P<sub>2</sub> sobre la piruvatoquinasa sólo se ha notificado para organismos unicelulares (Van Schaftingen y col., 1985; Miyatake y col., 1986; Cazzulo y col., 1989; Takeanaca y col., 1989) y en músculo rojo del molusco *Busicotopus canaliculatum* (Plaxton y Storey, 1984) y en la mayoría de los casos con concentraciones superiores a 0,3 µM, por lo que su acción activadora en piruvatoquinasa de músculo de lubina puede ser significativa. Además, el efecto activador se manifiesta en extracto crudo (figura 4), contrariamente a lo que ocurre con el resto de moduladores. En este sentido cabe señalar que la ausencia de sensibilidad mostrada ante la F-1,6-P<sub>2</sub> pudiera deberse a la saturación de la enzima "in vivo".

A pesar de la similitud estructural de ambas hexosas, la unión de la F-2,6-P<sub>2</sub> a la enzima parece ser específica. El efecto de ambas es aditivo, similar a lo descrito por Speranza y col. (1990) para PK de *Escherichia coli*, lo que podría indicar sitios independientes de unión, que vendría también apoyado por la diferencia en la sensibilidad a estos efectores en extracto crudo, (como ya hemos señalado en el parrafo anterior). Por otra parte, la influencia de la F-2,6-P<sub>2</sub> sobre esta actividad enzimática puede tener un gran significado fisiológico considerando que el efecto conjunto de ambas hexosas bifosforiladas hace que se duplique la afinidad

por el sustrato (PEP), lo que no se consigue con ninguna de ellas independientemente.

El comportamiento de ambos activadores es similar, aunque la potencia activadora de la F-1,6-P<sub>2</sub> es superior, lo que también se ha observado para otras piruvatoquinasas sensibles a ambos efectores (Miyatake y col., 1986; Takeanaka y col., 1989; Plaxton y Storey, 1984). La presencia de los dos activadores a pH 6,8 no altera el aumento de la afinidad observado para el sustrato PEP a este pH fisiológico, hecho que apoyaría la hipótesis de Dobson y col. (1987) en el sentido de que una disminución del pH intracelular, producido en el músculo de peces durante el ejercicio, no sólo no afectaría al funcionamiento de las enzimas glicolíticas sino que se favorecería, al menos al nivel de esta actividad piruvatoquinásica.

Contrariamente a lo que ocurre en la enzima de hígado de esta especie (Fideu y col., 1985) y en algunos músculos de peces (Johnston, 1977; Randall y Anderson, 1975; Somero y Hochachka, 1968; Guderley y Cardenas, 1980b) esta piruvatoquinasa no muestra inhibición ni por alanina ni por ATP, aunque sí por fenilalanina y fosfocreatina, comportamiento también lo descrito por Bannister y Anastasi (1976) y Moon y Hulbert (1980b) para músculo blanco de diversas especies de peces. La existencia de dos diferentes sitios de unión para los dos aminoácidos según lo descrito por Ibsen y Tripet (1974) para mamíferos (la enzima de tipo L tendría un sitio para la alanina, la de tipo M para la fenilalanina y la de tipo K para ambas), podría justificar el diferente comportamiento de estos dos compuestos en esta piruvatoquinasa.

El efecto inhibidor de fenilalanina se pone de manifiesto a concentraciones tan bajas como la intracelular (0,05 mM) pero no sobrepasa el 50% de inhibición aunque se empleen concentraciones elevadas (8 mM), lo que estaría de acuerdo con la menor sensibilidad a este compuesto de la piruvatoquinasa de teleosteos marinos (Roberts y Anderson, 1985; Guderley y Cardenas, 1980b) respecto a la de los de agua dulce (Johnston, 1975). Esta inhibición es menos evidente a bajas concentraciones de PEP, al igual que ocurre en la isoenzima M de mamíferos (Ibsen y Tripet, 1974). La presencia de fenilalanina produce un incremento en la cooperatividad positiva y una disminución en la  $V_{max}$ , siendo la inhibición de tipo acompetitivo, lo que indicaría que se une a un sitio diferente al activo y su acción podría ser debida a la interacción con un grupo hidrofóbico de la proteína produciendo un cambio conformacional en la misma (Izbicka-Dimitrijevic y col., 1981; Ibsen y Tripet, 1974).

La fosfocreatina, como ya hemos indicado, también actúa como inhibidor de la piruvatoquinasa de músculo blanco de lubina, a semejanza de lo que ocurre en este mismo tejido de otros orígenes (Kemp, 1973; Munday y col., 1980; Guderley y col., 1976; Wieser, 1977; Wieser y col., 1977; Wu y col., 1977). Su efecto es superior al mostrado por la fenilalanina y el tipo de inhibición es competitivo. La fosfocreatina tiene la función de almacenar energía en forma de enlaces fosfato, ayudando a mantener los niveles de ATP. Durante la contracción muscular la reducción de los niveles de fosfocreatina eliminará la inhibición de la piruvatoquinasa en este tejido, activando la glicólisis, lo cual ayudaría a regenerar los niveles normales de ATP. La concentración de fosfocreatina varía más que la del ATP (Dobson y col., 1987), con lo que este metabolito podría jugar un

papel fundamental sobre esta actividad enzimática en músculo blanco y se podría sugerir que actúa como un inhibidor de tipo competitivo de forma semejante a como lo haría el ATP en otras piruvatoquinasas (Kemp, 1973; Munday y col., 1980)

La acción inhibidora de fenilalanina y fosfocreatina es eliminada por la presencia tanto de F-1,6-P<sub>2</sub> como F-2,6-P<sub>2</sub>. La primera manifiesta su efecto activador en presencia de ambos inhibidores y la F-2,6-P<sub>2</sub> elimina la inhibición sin mostrar activación. Estos hechos apoyarían también la hipótesis de la existencia de dos sitios de unión independientes para las dos hexosas bifosforiladas. Un efecto semejante de la F-1,6-P<sub>2</sub> en presencia de fenilalanina se ha descrito sobre piruvatoquinasa de otros músculos de peces (Moon y Hulbert, 1980; Fields y col., 1978) e invertebrados marinos (Carvajal y col., 1986).

En resumen de lo expuesto, se puede decir que en circunstancias en las que se requiere un alto poder energético, como por ejemplo, en la natación rápida, la F-1,6-P<sub>2</sub> podría activar la PK de músculo de lubina y eliminar la inhibición por fenilalanina y fosfocreatina y así activar la glicólisis. A su vez, la F-2,6-P<sub>2</sub> contribuiría activando la ruta glicolítica al eliminar también el efecto producido por los inhibidores sobre la PK.

Respecto a su clasificación isoenzimática, esta piruvatoquinasa presenta propiedades cinéticas y reguladoras semejantes a las del tipo K (M<sub>2</sub>) de mamíferos ya que manifiesta una ligera cooperatividad positiva respecto al PEP y no respecto al ADP, presenta activación por F-1,6-P<sub>2</sub> y no es sensible al ATP; posee también algunas características del tipo M (M<sub>1</sub>) de

mamíferos, ya que se inhibe por fenilalanina y fosfocreatina y no por alanina y el efecto de sus moduladores no es dependiente del pH (Kemp, 1973; Izbicka-Dimitrijevic y col., 1981; Bannister y Anastasi, 1976; Ibsen y Tripet, 1974; Robert y Anderson, 1985). Estudios recientes parecen mostrar que los tipos M ( $M_1$ ) y K ( $M_2$ ) son producto de un sólo gen que puede dar dos moléculas diferentes de mRNA (Hence y col., 1982; Noguchi y Tanaka, 1982; Takeanaka y col., 1989). En general, en peces parece ser que la distribución de la actividad en los tejidos y la reactividad inmunitaria sugieren que el tipo M se expresa en músculo aunque presentando propiedades cinéticas semejantes a las del tipo K de mamíferos (Guderley y col., 1983; Guderley y col., 1989).

Debido a los pocos estudios realizados sobre el efecto de la F-2,6- $P_2$  en PK de diferentes orígenes, no se puede precisar acerca de la influencia en sus diferentes isoenzimas por lo que consideramos que es un claro aporte, desde el punto de vista de investigación básica, la notificación de la influencia observada sobre esta piruvatoquinasa de músculo de lubina.

De los resultados obtenidos y presentados en esta memoria, y de su comparación con las propiedades cinéticas y reguladoras de otras piruvatoquinasas de peces investigadas, tanto por nuestro grupo como por otros autores, podemos deducir que esta enzima en peces presenta una mayor similitud de comportamiento en los diferentes tejidos que la que se observa en mamíferos, donde la enzima presenta marcadas diferencias; lo que parece sugerir que la piruvatoquinasa de peces presenta una menor divergencia evolutiva.

### VI.3. FOSFOFRUCTOQUINASA.

La mayor actividad específica de la fosfofructoquinasa en lubina, al igual que en la piruvatoquinasa, se ha encontrado en el músculo blanco, lo que corrobora que este tejido posee un alto potencial glicolítico. Como se ha indicado en el apartado VI.1. la relación intracelular  $F6P/F-1,6-P_2$  pone de manifiesto que la reacción catalizada por la PFK es la etapa limitante de la glicolisis, por lo que se ha tratado de estudiar las propiedades cinéticas y reguladoras de esta enzima, relacionándolas dentro de lo posible, con el medio ambiente de este organismo y la fisiología del tejido.

Los valores de pH óptimo (8,0) y de  $E_a$  (34,4 KJ/mol) encontrados para esta enzima son similares a los descritos para la fosfofructoquinasa de hígado de esta misma especie (Fideu, 1986), y en el mismo rango que los encontrados para la enzima de diferentes tejidos de otras especies de peces (Sand, 1981a; Jensen, 1982). Cabe señalar que, aunque, el pH óptimo de la enzima es más alto que el fisiológico, esta fosfofructoquinasa es estable en el intervalo de pH intracelular.

Respecto a sus dos sustratos, F6P y  $MgATP^{2-}$  la fosfofructoquinasa presenta cinética bifásica en extracto crudo, similar a la encontrada en hígado de esta especie (Fideu y col., 1985b), aunque en este caso sólo se manifiesta respecto a la F6P. Esta cinética bifásica de la PFK para uno o los dos sustratos se ha observado en diversos tejidos de peces (Gaitan y col., 1989, 1990c y d) y de otros orígenes (Lee y col., 1973; Kelly y Turner, 1971; De la Fuente y Sabater, 1974).

En el proceso de purificación se obtienen dos picos con actividad fosfofructoquinásica que sugieren la

existencia de dos formas de la enzima, que podrían explicar la cinética bifásica observada en el extracto crudo para ambos sustratos. Los parámetros cinéticos de ambas formas enzimáticas son diferentes y hay una correspondencia de estos valores con los obtenidos para los dos tramos de la curva bifásica. La actividad PFK-M<sub>1</sub> (que no es retenida en la columna de afinidad) presenta ligera cooperatividad positiva para la F6P y cooperatividad negativa para el MgATP<sup>2-</sup>, presentando menor afinidad por ambos sustratos que la que se observa en la isoenzima obtenida en la elución. La PFK-M<sub>2</sub> presenta una cooperatividad negativa respecto a F6P y cinética hiperbólica para el MgATP<sup>2-</sup>. La hipótesis señalada, de la contribución de dos formas enzimáticas para producir una cinética bifásica, se corrobora al realizar el estudio con la mezcla de ambas formas donde se observa una cinética semejante a la obtenida con extracto crudo. Un comportamiento similar también se ha descrito en tejido hematopoyético de trucha (Gaitan y col., 1990b) y en hígado de esta misma especie (Fideu y col., 1989), si bien la proporción de ambas formas enzimáticas presentes en el músculo parece ser diferente, al contrario que lo observado en hígado.

Además, ambas formas enzimáticas se saturan a concentraciones de F6P muy similares: 0,8 mM para la forma PFK-M<sub>1</sub> y 1 mM la forma PFK-M<sub>2</sub>, permitiendo una mayor regulación de la actividad por este sustrato, a diferencia de lo observado en hígado donde una de las formas se satura a concentraciones bajas. Aunque la forma PFK-M<sub>1</sub> está en cantidades minoritarias respecto a la otra forma, lo que se traduce en una actividad 10 veces inferior, al analizar la cinética bifásica que produce la actuación conjunta de ambas isoenzimas, se observa un aumento de la cooperatividad, influencia que en definitiva conduce a que se favorezca la unión del sustrato a medida que



aumenta su concentración. Es decir, podrá haber una regulación por el sustrato F6P tanto a altas como a bajas concentraciones del mismo.

El análisis electroforético de ambas formas mostró una única banda lo que indica una gran homogeneidad de las dos fracciones con actividad obtenidas en el proceso de purificación. El peso molecular de las subunidades de la PFK-M<sub>1</sub> y de la PFK-M<sub>2</sub> dos formas enzimáticas, determinado por electroforesis en condiciones desnaturalizantes es de  $73.000 \pm 3.500$  daltons, semejante al descrito para las diferentes isoenzimas de mamíferos como se indicó en el apartado 1.6. Asimismo, el volumen de elución en la cromatografía de filtración en gel coincide para las dos. El que las dos formas enzimáticas tengan un peso molecular similar, aunque sus propiedades cinéticas y reguladoras sean diferentes, ha sido también descrito para la PFK de hígado de esta misma especie (Fideu, 1986) y para la PFK-2 de *Dictyostelium discoideum* (Gomez, 1990).

El  $Mg^{2+}$  libre (2,5 mM) actúa como inhibidor de la PFK-M<sub>1</sub>, a semejanza de lo observado en fosfofructoquinasas de otros orígenes (Fideu y col., 1985a; Otto y col., 1974, Buckwitz y col., 1990, Hausler y col., 1989; Isaac y Rhodes, 1986; Bloxhan y Lardy, 1973). Contrariamente sobre la PFK-M<sub>2</sub> actúa como activador, efecto que también se ha observado en otras fosfofructoquinasas (Uyeda, 1979; Bloxhan y Lardy, 1973; Cronin y col., 1988; Etienne y col., 1981). Este efector actuando sobre las dos formas enzimáticas conjuntamente produce una cinética hiperbólica que también se pone de manifiesto en extracto crudo para esta misma concentración. La  $K_m$  aparente disminuye aproximadamente en un 50%, en relación a la observada en extracto crudo, lo que parece indicar que predomina el efecto activador

sobre la forma enzimática PFK-M<sub>2</sub>, que presenta tanto la mayor actividad como la mayor afinidad, cuando ambas formas enzimáticas actúan conjuntamente.

La sensibilidad a la inhibición por ATP difiere significativamente en las fosfofructoquinasas de diferentes orígenes, habiéndose observado que es mas pronunciada en las de hígado que en las de músculo (Tsai y col., 1974; Sand, 1981b). En presencia de ATP<sup>4-</sup> libre se puede observar un efecto inhibidor de tipo competitivo para ambas formas, PFK-M<sub>1</sub> y PFK-M<sub>2</sub>, y sus constantes de inhibición coinciden con las determinadas para los dos tramos de la curva bifásica. La K<sub>i</sub> de la PFK-M<sub>1</sub> coincide con la obtenida para la zona de altas concentraciones de sustrato y su valor es mayor que el obtenido para la PFK-M<sub>2</sub>, coincidente con la hallada para el intervalo de bajas concentraciones. Ambas constantes de inhibición son superiores a las encontradas para hígado de esta misma especie (Fideu y col., 1985a) y para hígado de lenguado (Sand, 1981b) pero similares a las de músculo de bacalao (Leaver y Burt, 1981). El porcentaje de inhibición por ATP<sup>4-</sup> libre es semejante en las dos formas enzimáticas en presencia de diferentes concentraciones de ambos sustratos. Cabe señalar, no obstante, una inhibición mas acusada de la PFK-M<sub>2</sub> a concentraciones bajas de F6P (0,15 mM).

Por otra parte, como sería lógico esperar en animales ectotermos, esta inhibición se modifica por la temperatura, haciendose menos intensa a medida que esta disminuye, siendo nula a 5°C, efecto que no se manifiesta en hígado de esta especie (Fideu y col., 1985a). La ausencia de inhibición por ATP<sup>4-</sup> en estas condiciones desfavorables, unido a la termorregulación observada en la enzima a esta temperatura, ya que a 5°C la forma enzimática PFK-M<sub>1</sub> muestra un aumento de afinidad por la

F6P así como un incremento marcado de la cooperatividad positiva respecto al otro sustrato  $\text{MgATP}^{2-}$ , ayudaría a compensar al menos en parte, la influencia de esta baja temperatura, permitiendo un determinado nivel de actividad de la PFK.

Asímismo, se ha podido observar una notable reducción de la inhibición por  $\text{ATP}^{4-}$  al pH 6,8 más próximo al fisiológico, aunque los parámetros cinéticos de la enzima no parecen afectarse significativamente al variar el pH de 8,0 a 6,8.

De lo expuesto en párrafos anteriores y teniendo en cuenta que la relación fisiológica  $\text{Mg}/\text{ATP}$  es 9:1, podría decirse que esta PFK no está inhibida "in vivo" por  $\text{ATP}^{4-}$  y la inhibición por esta forma iónica sería improbable, pudiendo, sin embargo estar activada por el  $\text{Mg}^{2+}$  libre.

Del estudio de los diferentes moduladores característicos de la fosfofructoquinasa en ambas isoenzimas se puede decir que esta actividad enzimática en músculo de lubina está poco regulada, excepto por F-1,6- $\text{P}_2$ . El poder activador de este compuesto es mucho más intenso para la forma enzimática PFK- $\text{M}_2$  que a su vez es ligeramente activada por  $\text{NH}_4$  y PEP. El efecto activador del PEP, contrariamente a lo observado para la mayoría de las fosfofructoquinasas (Bloxhan y Lardy, 1973; Uyeda, 1979) también se ha observado en hígado de esta misma especie aunque con mayor intensidad (Fideu, 1989). Asímismo el citrato, destacado regulador de esta vía metabólica, no ejerce influencia sobre ninguna de las formas enzimáticas detectadas por nosotros, lo cual parece lógico ya que el músculo blanco de peces es exclusivamente glicolítico, como se ha indicado anteriormente.

Habría que resaltar también que aunque la PFK de músculo en general es menos modulado por F-2,6-P<sub>2</sub>, sobre esta PFK muestra su efecto activador, aunque no muy marcado, comparable al producido por la G-1,6-P<sub>2</sub>. La presencia conjunta de F-2,6-P<sub>2</sub> y G-1,6-P<sub>2</sub> sobre la PFK-M<sub>2</sub> produce un efecto que se puede considerar aditivo, lo que no se observa para la otra forma, PFK-M<sub>1</sub>. Esto podría de dos lugares de unión diferentes para la PFK-M<sub>2</sub>, lo cual ha sido notificado por Andres y col. (1988) para músculo de rata, y un único sitio de unión para la PFK-M<sub>1</sub>, lo que ha sido descrito para fosfofructoquinasas de otros músculos (Foe y col., 1983; Kitajima y Uyeda, 1983; Tornhein, 1985).

Según las propiedades descritas para las diferentes formas isoenzimáticas (Vora y col., 1985a y b; Tanaka y col., 1972; Dunaway, 1983; Kemp y Foe, 1983) la PFK-M<sub>1</sub> tiene características similares a las de la PFK-L de mamíferos aunque posea algunas propiedades de la de músculo como son la activación por ADP, la baja actividad enzimática o la falta activación por NH<sub>4</sub>. La PFK-M<sub>2</sub> tiene propiedades que se asemejan más a la PFK-M de mamíferos aunque alguna de sus características sean semejantes a la PFK-L. Esto nos lleva a pensar que ambas formas enzimáticas pudieran ser híbridos L-M, aunque en la forma PFK-M<sub>1</sub> predominaría la forma L y en la otra la forma M.

CONCLUSIONES.

## VII. CONCLUSIONES.

En este trabajo, se han investigado las propiedades fisico-químicas, cinéticas y reguladoras, así como la posible presencia de diferentes formas enzimáticas de piruvatoquinasa y fosfofructoquinasa de músculo blanco de lubina, debido a su importante papel en la regulación de la ruta glicolítica, relacionándolas, dentro de lo posible, con el medio ambiente de este organismo y la fisiología del tejido. Del conjunto de los resultados obtenidos podemos concluir:

El músculo blanco de lubina posee una gran actividad glicolítica ya que la concentración intracelular de intermediarios glicolíticos y nucleótidos de adenina es elevada y la mayor actividad específica de las enzimas reguladoras de esta ruta, piruvatoquinasa y fosfofructoquinasa, se ha encontrado en este tejido.

Respecto a la piruvatoquinasa, se ha observado una única forma enzimática que presenta cinética sigmoideal respecto al PEP, siendo activada por F-1,6-P<sub>2</sub>; F-2,6-P<sub>2</sub> e inhibida por fenilalanina y fosfocreatina. Estas propiedades indican la enzima tiene propiedades semejantes a las del tipo K (M<sub>2</sub>) de mamíferos aunque posea algunas características similares a la del tipo M (M<sub>1</sub>) de mamíferos. Es de resaltar que la activación por F-2,6-P<sub>2</sub> puede tener significado fisiológico y es la primera vez que se ha notificado en esta clase de organismos.

La actividad fosfofructoquinásica de este tejido proviene de la participación de dos formas enzimáticas cuya actuación conjunta manifiesta una cinética bifásica. El comportamiento cinético y la acción de los moduladores indican que ambas formas (PFK-M<sub>1</sub> y PFK-M<sub>2</sub>)

podrían ser híbridos de las correspondientes isoenzimas M y L de mamíferos, con predominio de uno y otro tipo en cada forma.

Tanto la piruvatoquinasa como la fosfofructoquinasa de este tejido, no parecen mostrar termorregulación, excepto a 5°C, donde las variaciones observadas en los parámetros cinéticos podrían indicar una tendencia a compensar esta temperatura extrema del habitat de la lubina.

La regulación de esta vía glicolítica, a nivel de estas dos actividades enzimáticas, teniendo en cuenta la nula o escasa regulación observada por ATP, parece venir dada fundamentalmente por la activación por la F-1,6-P<sub>2</sub> que es capaz de activar, eliminando el efecto de la fosfocreatina, la piruvatoquinasa y es el activador más potente de la fosfofructoquinasa en este tejido. En periodos de ejercicio prolongado, la disminución de fosfocreatina y la mayor afinidad por el PEP observada en la piruvatoquinasa al disminuir el pH, contribuirán al buen funcionamiento de la ruta glicolítica, considerando además que aunque la concentración de F-1,6-P<sub>2</sub> disminuya es suficiente para producir activación en ambas enzimas.

RESUMEN .



#### VIII. RESUMEN.

El objeto de este trabajo consiste en aportar una serie de datos experimentales que lleven a caracterizar la piruvatoquinasa y la fosfofructoquinasa de músculo blanco de lubina, enzimas claves de la glicólisis. Los resultados de estos experimentos conduciran a un mayor conocimiento de la bioquímica de esta especie que podría ser utilizado para una mejora de su cultivo controlado.

Para esto en primer lugar se han determinado las concentraciones intracelulares de los compuestos que puedan influir en la regulación de la fosfofructoquinasa y piruvatoquinasa y posteriormente se han aislado, purificado y caracterizado estas enzimas.

Del conjunto de los resultados obtenidos podemos concluir que el músculo blanco de lubina posee una gran actividad glicolítica, con un elevado potencial anaeróbico, ambas enzimas son alostéricas y muestran una ligera termorregulación presentando la fosfofructoquinasa dos formas enzimáticas diferentes en este tejido.

BIBLIOGRAFIA.

## IX. BIBLIOGRAFIA.

- ABBE, K. y YAMODA, T. (1982). Purification and properties of pyruvate kinase from *streptococcus mutans*, J. Bacteriol. 149, 299-305.
- AINSWORTH, S. y MCFARLANE, M. (1973). A kinetic study of rabbit muscle pyruvate kinase. Biochem. J. 131, 223-236.
- AKKERMAN, J.W.M. (1985). Does fructose 1,6 bisphosphate reflect its phosphofructokinase activity?, Trends. Biochem. Science, 10, 187-188.
- ALLIOT, E.; PASTOUREAUD, A. y NEDELEC, J. (1979). Etude de l'apport calorique et du apport calorico-azote dans l'alimentation du bar (*Dicentrarchus labrax*). Proc. World. Symp. Finfish nutrition and fishfeed technology. Hamburg, 20-23 June, (Eds. J.E. Halves and K. Tiews), Vol I, pp 241-251.
- ANDRES, V.; CARRERAS, J. y CUSSO, R. (1988). Activation of muscle phosphofructokinase by  $\alpha$ -glucose 1,6 bisphosphate and fructose 2,6 bisphosphate is differently affected by other allosteric effectores and by pH. Biochem. Biophys. Res. Commun. 164, 664-669.
- ASHIZAWA, K.; WILLINGHAN, M.C.; LIANG, C.H. y CHENG, S.Y. (1991) In vivo regulation of monomer-tetramer conversion of pyruvate kinase type M<sub>2</sub> by glucose mediated via fructose 1,6 bisphosphate. J. Biol. Chem. 266, 16842-16846.
- ATKINSON, D.E.; HATHAWAY, J.A. y SMITH, E. C. (1965). Kinetics of regulatory enzymes: effectors for yeast phosphofructokinase do not alter the apparent kinetic order of the reaction. Biochem. Biophys. Res. Commun. 18, 1-16.
- ATKINSON, D.E. y WALTON, G.H. (1967). Adenosin triphosphate conservation in metabolic regulation. J. Biol. Chem. 242, 3239-3242.
- BACHAND, L. y LERAY, C. (1975). Erythrocyte metabolism in the yellow perch (*Perca flavescens* Mitchell) I. Glycolytic enzymes. Comp. Biochem. Physiol. 50B, 567-570.
- BANGLY, D.; BUC, H. y MONOD, J. (1968). J.M.B. 31, 13.
- BANNISTER, P. y ANASTASI, J. (1976). The effect of fructose 1,6 bisphosphate on pyruvate kinase from white muscle of three species of mediterranean fish. Comp. Biochem. Physiol. 55B, 449-451.
- BAUTISTA, J.M.; GARRIDO PERTIERRA, A. y RUIZ AMIL, M. (1984). Purification and properties of two enzymatic forms of glucose 6 phosphate dehydrogenase from *Dicentrarchus labrax* L. liver. Comp. Biochem. Physiol. 77B, 843-848.
- BEHM, C.A. y BRYANT, C. (1980). Regulatory properties of a partially purified preparation of pyruvate kinase from *Fasciola hepatica*. I.J. for Parasitology. Vol 10, pp 107-114.
- BERGMAYER, H.U. (1974). En "Methods of enzymatic analysis". (Ed. H.U. Bergmeyer), 2a edn. Academic Press, New York, Vol I, III y V.
- BERNHARD, H. (1968). En "The structure and functions of enzyme", Benjamin, New York, pp 286.

- BIETHINGER, H.; HOFFMAN, R. y HOFFER, W.R. (1991). Phosphofructokinase from mollusc muscle is activated by phosphorylation. *Arch. Biochem. Biophys.* 287, 263-267.
- BLOKHAN, D.P. y LARDY, H.A. (1973). Phosphofructokinase. En "The Enzymes", Vol 8, 3a ed. (Ed. Boyer, P.D.), Academic Press, New York, pp 239-278.
- BONE, Q. (1978). Locomotor muscle. En "Fish Physiology". (Eds, W.S. Hoar y D.J. Randall), Academic Press, New York, Vol VI, 361-424.
- BONE, Q. (1986). Biology of fishes. (Eds. Q. Bone y M.A. Marshall), Blackie, Glasgow and London, Coleccion Tertiary level biology.
- BOSCA, L. y CORREDOR, C. (1984). Is phosphofructokinase the rate limiting step of glycolysis?, *Trends, Biochem. Science*, 9, 372-373.
- BOSCA, L.; ARAGON, J.J. y SOLS, A. (1985). Modulation of muscle phosphofructokinase at physiological concentration of enzyme, *J. Biol. Chem.* 260, 2100-2107.
- BRADFORD, M.M. (1976). *Anal. Biochem.* 72, 248-254.
- BROOKS, S.J. y STOREY, K.B. (1990). Phosphofructokinase from a vertebrate facultative anaerobe: effects of temperature and anoxia on the kinetic parameters of the purified enzyme from turtle white muscle. *Biochim. Biophys. Acta*, 1037, 161-164.
- BUCKWITZ, D.; JACOBASH, G. y GERTH, C. (1990). Phosphofructokinase from *plasmodium berghei*: Influence of  $Mg^{2+}$ , ATP and  $Mg^{2+}$ -complexed ATP. *Biochem. J.* 267, 353-357.
- BURTON, J. y BURTON, M. (1978). La vida en el mar. Castell S.A. Barcelona pp 38.
- CANN-MOISAN, J.; CAROFF, J.; SEBERT, P. y BARTHELEMY, L. (1989). Comparative study of energetic nucleotides in young and adult trout (*Salmo gairdneri* R). *Aquaculture*, 81, 91-96.
- CARDENAS, J.M.; DYSON, R.D. y STRANDHOLM, J.J. (1975). Pyruvate kinase. En "Isozymes". (Ed. C.L. Market), Academic Press, New York, Vol I, pp 523-541.
- CARNAL, N.W. y BLACK, C.C. (1979). Pyrophosphate-dependent 6-phosphofructokinase, a new glycolytic enzyme in pineapple leaver. *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 86, 20-26.
- CARVAJAL, N.; GONZALEZ, R. y MORAN, A. (1986). Properties of pyruvate kinase from the heart of *Concholepas concholepas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 85B, 577-580.
- CAZZULO, J.J.; CAZZULO FRANKE, H.C. y FRANKE DE CAZZAULO, B.H. (1989). On the regulatory properties of the pyruvate kinase from *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. *Comp. Biochem. Physiol.* 83B, 259-264.
- CHEVREY, P. (1925). Reserches sur la perche et le bar. Etude embryologique, systematique et biogeografique des percides europeens. *Bull. Biol. France-Belgique-Paris*, 59, 145-292.
- COLL MORALES, J. (1983). Acuicultura marina animal. Mundiprensa, Madrid, pp 200-213.
- COLOMBO, G.; TATE, P.W.; GIOTTI, A.W. y KEMP, R.J. (1975). Interation of inhibitors with muscle phosphofructokinase. *J. Biol. Chem.* 250, 9404-9412.

- CRONIN, C.N. y TIPTON, R.F. (1988). The roles of magnesium ions in the reaction catalysed by phosphofructokinase from *Trypanosoma brucei*, *Biochem. J.* 247, 41-46.
- CORI, C. (1942). En "Symposium on respiratory enzymes", Madison Wisconsin, University of Wisconsin Press, pp 173.
- CORNISH, A.S. y JHONSON, I.J. (1971). *Arch. Biochem. Biophys.* 142, 584.
- CORTESI, P.; FABRI, D.; ISANI, G.; CATTANI, O. y CARPENE, E. (1985). Characterization of pyruvate kinase isolated from the adductor muscle of the mollusc *Scapharca inaequivalvis*, *Comp. Biochem. Physiol.* 81B, 123-129.
- COWEY, C.B. y SEARGENT, J.R. (1977). Lipid nutrition in fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 57B, 269-273.
- CRABTREE, B. (1985). Modelling and quantifying metabolic control systems. *Trends. Biochem. Scien.* 10, 188.
- CZOK, R. y LAMPRECHT, W. (1974). Pyruvate, phosphoenolpyruvate, D-glycerate-2-phosphate. En "Methods of enzymatic analysis", 2ª edn. (Ed. H.U. Bergmeyer), Academic Press, New York, Vol III, pp 1446-1451.
- D'ANCONA, H. (1970). Tratado de zoología, Zoología especial. Labor S.A. Barcelona-Madrid, Vol II, pp 897.
- DAGLEY, S. (1974). Citrate UV spectrophotometric determination, En "Methods in enzymatic analysis", 2ª ed. (Ed. H.U. Bergmeyer), Academic Press, New York, Vol III, pp 1802-1806.
- DAVIS, B.J. (1964). Disc electrophoresis II. Method and application to human serum proteins. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 121, 404-427.
- DEVILLE-BONE, D.; BOURGAIN, F. y GAREL, J.R. (1991). pH dependence of the kinetic properties of allosteric phosphofructokinase from *Escherichia coli*. *Biochemistry.* 30, 5750-5754.
- DE LA FUENTE, B. y SABATER, G. (1974). Kinetic properties and related changes of molecular weight in a fructokinase from *Streptomyces violaceoruber*, *Biochim. Biophys. Acta.* 377, 258-270.
- DE ZWAAN, A. y EBBERINK, R. (1978). Apparent inhibition of pyruvate kinase by arginine phosphate, *FEBS letters.* 89, 301-303.
- DIEDRIZIC, W.C. y HOCHACHKA, P.W. (1978). Carbohydrate metabolism. En "Fish physiology", (Ed. W.S. Hoard y D.J. Randall), Academic Press, New York, Vol III, pp 503-543.
- DIXON, M. y WEBB, E.C. (1979). Pyruvate kinase. In "Enzymes", 3ª edn. Longman group limited, Academic Press, New York, pp 708-714.
- DOBSON, G.P. (1986). Metabolic regulation in skeletal muscle during exercise: a fish mammal comparison. Tesis Doctoral, University of British Columbia, pp 150.

- DOBSON, G.P. y HOCHACHKA, P.W. (1987). Role of glycolysis in adenylate depletion and repletion during work and recovery in teleost white muscle. *J. Exp. Biol.* **129**, 125-140.
- DOBSON, G.P.; PARKHOUSE, W.S. y HOCHACHKA, P.W. (1987). Regulation of anaerobic ATP-generating pathways in trout fast-twitch skeletal muscle. *Am. Physiol. Soc.* **363**, R186-R194.
- DOBSON, G.P.; YAMAMOTO, E. y HOCHACHKA, P.W. (1986). Phosphofructokinase control in muscle: nature and reversal of pH-dependent ATP inhibition. *Amer. J. Physiol.* **250**, R71-R76.
- DOELLE, H.W. (1972). Kinetic characteristic of phosphofructokinase from *Lactobacillus casei* var. *ramnosus* ATCC 7496 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 14917. *Biochem. Biophys. Acta.* **258**, 404-410.
- DUNAWAY, G.A. (1983). A review of animal phosphofructokinase isozymes with an emphasis on their physiological role. *Moll. Cell. Biochem.* **52**, 75-91.
- EASTARDAY, R.L. y EASTARDAY, J.M. (1974). Affinity chromatography of kinases and dehydrogenases on Sephadex and Sepharose dye derivatives. En "Immobilized biochemicals affinity chromatography", (Ed. R. Bruce), Dunlop, New York-London, pp 123-133.
- EBBERINK, R. (1980). Regulation of anaerobic carbohydrate degradation in the sea mussel (*Mytilus edulis* L.). Tesis doctoral. The State University, Utrecht.
- ENGELHARDT, V.A. y SAKOV, N.E. (1943). *Biokhimiya*, **2**, 9.
- ENGSTROM, L. (1978) The regulation of liver pyruvate kinase by phosphorylation-dephosphorylation. En "Current topics in cellular regulation", (Eds. B.L. Horecker y E.R. Stadman), Academic Press, New York, Vol 13, pp 29-51.
- EPPLE, A. (1969). The endocrine pancreas. En "Fish Physiology", (Eds. W.S. Hoar y D.J. Randall), Academic Press, New York, Vol II, pp 279-314.
- ETIENBLE, J.; SIMEON, J.; PICAT, C.H. y BOIVIN, P. (1981). Influence of free  $Mg^{2+}$  on the kinetics of human erythrocyte phosphofructokinase. *Biochimie*, **63**, 61-65.
- FELL, D.A. (1984). Phosphofructokinase and glycolytic flux. *Trends. Biochem. Sci.* **9**, 515-516.
- FERDINANDUS, J. y CLARK, J.A. (1969). The phosphofructokinase of *Arthrobacter crystallopoietes*. *Biochem. J.* **113**, 735-736.
- FOE, L.G.; LATSHAW, S.P. y KEMP, R.G. (1983). Binding of hexose bisphosphates to muscle phosphofructokinase. *Biochemistry*, **22**, 4601-4606.
- FIDEU, M.D. (1986). Caracterización enzimática de la fosfofructoquinasa y piruvatoquinasa de hígado de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.
- FIDEU, M.S.; SOLER, G. y RUIZ-AMIL, M. (1983). Nutritional regulation of glycolysis in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R). *Comp. Biochem. Physiol.* **74B**, 795-799.

- FIDEU, M.D.; HERRANZ, M.J.; RUIZ-AMIL, M. y PEREZ, M.L. (1985a). Influence of ATP and magnesium on phosphofructokinase from sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) liver. Comp. Biochem. Physiol., 81 B, 1067-1071.
- FIDEU ALONSO, M.D.; PEREZ PEREZ, M.L.; HERRANZ SANTOS, M.J. y RUIZ AMIL, M. (1985b). Thermic modulation of phosphofructokinase (PFK) of sea bass (*Dicentrarchus labrax* L.) liver. Comp. Biochem. Physiol., 80 B, 623-628.
- FIDEU, M.D.; PEREZ, M.L.; RUIZ-AMIL y HERRANZ, M.J. (1985c). Regulation of sea bass pyruvate kinase by temperature, substrate and some metabolic effectors. Comp. Biochem. Physiol., 82 B, 841-848.
- FIDEU, M.D.; HERRANZ, M.J.; RUIZ-AMIL, M. y PEREZ, M.L. (1986). Pyruvate kinase of sea bass liver. Interrelationship in regulating properties. Comp. Biochem. Physiol., 83 B, 685-689.
- FIDEU, M.D.; PEREZ, M.L.; HERRANZ, M.J. y RUIZ-AMIL, M. (1989). Regulation of glycolysis in sea bass liver: Phosphofructokinase isozymes. Rev. Españ. Fisiol., 45, 179-186.
- FIELDS, J.H.A.; DRIEDZORIC, W.R.; FRENZ, C.J. y HOCHACHKA, P.W. (1978). Some kinetic properties of skeletal muscle pyruvate kinase from air breathing and waterfish of the Amazon. Can. J. Zool., 56, 751-758.
- FREED, J.M. (1971). Properties of muscle phosphofructokinase of cold and warm acclimated *Carassius auratus*. Comp. Biochem. Physiol., 39 B, 747-764.
- FURUYA, E. y UYEDA, K. (1981). A novel enzyme catalyzes the synthesis of activation factor from ATP and D-fructose 6 phosphate. J. Biol. Chem., 256, 7109-7112.
- GAITAN, S. (1987). Estudio comparativo de la fosfofructoquinasa en células hematopoyéticas y eritrocitos de trucha arcoiris (*Salmo gairdneri* R.). Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas, Universidad Complutense de Madrid.
- GAITAN, S.; TEJERO, C. y RUIZ AMIL, M. (1983). Some comparative properties of pyruvate kinase in haematopoietic cells and erythrocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Comp. Biochem. Physiol., 74 B, 801-805.
- GAITAN, S.; RUIZ AMIL, M. y TEJERO, C. (1989). Influence of MgATP on phosphofructokinase during trout (*Salmo gairdneri* R.) haemopoiesis: modulation by pH and temperature. Int. J. Biochem., 21, 925-929.
- GAITAN, S.; RUIZ AMIL, M. y TEJERO, C. (1990a). Thermic and pH modulation of phosphofructokinase during trout (*Salmo gairdneri* R.) haemopoiesis: influence of fructose 6 phosphate. Biochem. Int., 21, 771-779.
- GAITAN, S.; RUIZ AMIL, M. y TEJERO, C. (1990b). Phosphofructokinase during haemopoiesis of the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). Its isoenzymatic forms. Biochem. Int., 21, 883-890.
- GAITAN, S.; CUENILLAS, E.; RUIZ AMIL, M. y TEJERO, C. (1990c). Regulation of phosphofructokinase during haemopoiesis of rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.): Kinetic studies. Com. Biochem. Physiol., 95 B, 641-646.

- GAITAN, S.; CUENLLAS, E.; RUIZ AMIL, M. y TEJERO, C. (1990d). Role of phosphofructokinase during trout haemopoiesis: physiological regulation of glycolysis, *Comp. Biochem. Physiol.* 95 B, 705-710.
- GILES, I.G.; POAT, P. y MUNDAY, K.A. (1976a). Purification and properties of pyruvate kinase from the hepatopancreas of *Carcinus naenas*, *Biochem. J.* 153, 127-134.
- GILES, I.G.; POAT, P. y MUNDAY, K.A. (1976b). The regulation of pyruvate kinase in the hepatopancreas of *Carcinus naenas*, *Comp. Biochem. Physiol.* 55 B, 423-427.
- GOMEZ, E. (1989). Aislamiento y caracterización de fructosaP- 2 kinasa/fructosa 2,6 Pasa de *Dicystostelium discoideum*, Tesis Doctoral, Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Autónoma de Madrid.
- GUDERLEY, H. y CARDENAS, J.M. (1980a). Pyruvate kinase of salmo. Purification and comparison with the isozymes from birds and mammals, *J. Exp. Zool.* 211, 185-198.
- GUDERLEY, H. y CARDENAS, J.M. (1980b). A study of catalytic properties of pyruvate kinase isozymes from salmo and examination of their functional relationship, *J. Exp. Zool.* 212, 269-277.
- GUDERLEY, H.; STOREY, K.B.; FIELDS, J.M.A. y HOCHACHKA, P.W. (1976). Catalytic and regulatory properties of pyruvate kinase isozymes from octopus mantle muscle and liver, *Can. J. Zool.* 54, 863-870.
- GUDERLEY, H.; HAMMEL, L. y LAFOND, J. (1983). Close resemblance between muscle pyruvate kinase from a primitive vertebrate, the river sturgeon *Acipenser flavescens*, and the ancestral type K isozyme, *J. Comp. Physiol.* 153, 247-256.
- GUDERLEY, H.; FOURNIER, R. y AUCLAIR, J.C. (1989). Phylogeny congruence analysis and isozyme classification: the pyruvate kinase system, *J. Theor. Biol.* 140, 205-220.
- GUPPY, M. y HOCHACHKA, P.W. (1979). Pyruvate kinase functions in hot and cold organs of tuna, *J. Comp. Physiol.* 129 B, 185-191.
- HALL, E.R. y COTTAN, L.G. (1978). Isozymes of pyruvate kinase in vertebrates: their physical, chemical, kinetic and immunological properties, *Int. J. Biochem.* 9, 785-793.
- HAND, S.C. y CARPENTER, J.F. (1986). pH-induced hysteretic properties of phosphofructokinase purified from rat myocardium, *Amer. J. Physiol.* 250, R505-R511.
- HAND, S.C. y SOMERO, G.N. (1983). Phosphofructokinase of the hibernator *Citellus beecheyi*: temperature and pH regulation of activity via influences on the tetramer-dimer equilibrium, *Physiol. Zool.* 56, 380-388.
- HAND, S.C. y SOMERO, G.N. (1984). Influence of osmolytes, thin filaments and solubility state on elasmobranch phosphofructokinase "in vitro", *J. Exp. Zool.* 231, 297-302.
- HAUSLER, R.E.; HOLTUM, J.A.M. y LATZKO, E. (1989). Cytosolic phosphofructokinase from spinach leaves II. Affinity for  $Mg^{2+}$  and nucleoside phosphates, *Plant. Physiol.* 90, 1506-1512.



- HENCE, A.J.; LEE, J. y FEITELSON, M. (1982). The M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> isozymes of pyruvate kinase are products of the same gen. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 106, 492-499.
- HESTERBERG, L.K. y LEE, J.C. (1982). Self association of rabbit muscle phosphofructokinase. Effects of ligands. *Biochemistry*, 21, 216-222.
- HITOS NATERA, M.P. XX Congreso Mundial de la viña y el vino, Madrid y La Rioja, 18-26 Mayo de 1992.
- HOCHACHKA, P.W. (1968). Action of temperature on branch points in glucose and acetate metabolism. *Comp. Biochem. Physiol.* 25, 107-118.
- HOCHACHKA, P.W. (1985). Fuels and pathways as designed systems for support of muscle work. *J. Exp. Biol.* 155, 149-164.
- HOCHACHKA, P.W.; OWEN, T.G.; ALLEN, J.F. y WHITTOW, G.C. (1975). Multiple end products of anaerobiosis in diving vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol.* 50 B, 17-22.
- HOFFER, H.W. y KISTEK, E. (1975). Determination of the kinetic parameters of phosphofructokinase dissociation. *FEBS lett.* 143, 141-144.
- HOLWERDA, D.A. y DE ZWAAN, A. (1973). Kinetic and molecular characteristics of allosteric pyruvate kinase from muscle tissue of the sea mussel *Mytilus edulis*. *Biochem. Biophys. Acta*, 309, 296-306.
- HORECKER, H. y KORNBERG, P.J. (1948). The extinction coefficient of the reduced band of pyridine nucleotides. *J. Biol. Chem.* 175, 385-390.
- HOUSTON, A.M.; MCCULLOG, C.A.M.; KEEN, J.; MADDALENA, C. y EDWARDS, J. (1985). Rainbow trout red cells "in vitro". *Comp. Biochem. Physiol.* 81 A, 555-565.
- HUDSON, M. (1973). On the function of the white muscle in teleosts and at intermediate swimming speeds. *J. Exp. Bio.* 58, 509-522.
- HUE, L.; BLACKMORE, P.F. y EXTON, J.H. (1981). Fructose 2,6 bisphosphate. Hormonal regulation and mechanism of its formation in liver. *J. Biol. Chem.* 256, 8900-8903.
- HULBERT, W.C. y MOON, T.W. (1978). The potential for lactate utilization by red and white muscle of eel (*Anguilla rostrata*). *Can. J. Zool.* 56, 128-135.
- HUNSLEY, J. y SUELTER, C.H. (1969). Yeast pyruvate kinase II kinetic properties. *J. Biol. Chem.* 244, 4819-4822.
- IBARGUREN, I.; VILLAMARIN, J.A.; BARCIA, R. y RAMOS MARTINEZ, J.I. (1989). Effect of hypoxia on glycolysis in the adductor muscle and hepatopancreas of the marine mussel *Mytilus galloprovincialis*. *Rev. Españ. Fisiol.* 45, 349-355.
- IBICKA-DIMITRIJEVIC, E.; MASTERLEZ, P. y KOCHMAN, M. (1981). Dual effects of phenylalanine analogs on rabbit muscle pyruvate kinase activity. *Eur. J. Biochem.* 114, 565-568.
- IBSEN, K.H. y TRIPET, P. (1974). Effects of aminoacids on the kinetic properties of three no interconvertible rat pyruvate kinases. *Arch. Biochem. Biophys.* 162, 570-580.

IMAMURA, S. y TANAKA, Y. (1982). Pyruvate kinase isozymes from rat, Methods in enzymology, Academic Press, New York, 90, 150-165.

ISAAC, J.E. y RHODES, M.J.C. (1986a). Phosphofructokinase from *Lycopersicon esculentum* fruits I. Kinetic properties in relation to its substrates, Phytochemistry, 15, 339-343.

ISAAC, J.E. y RHODES, M.J.C. (1986b). Phosphofructokinase from *Lycopersicon esculentum* fruits. II. Changes in the regulatory properties with dessociation, Phytochemistry, 25, 345-349.

ISHIKAWA, E.; OGUSHI, S.; ISHIKAWA, T. y UYEDA, K. (1990). Activation of mammalian phosphofructokinases by ribose 1,5 bisphosphate, J. Biol. Chem., 265, 18875-18878.

JACKMAN, L.A.J. (1954). The early development stages of the bass (*Morone labrax*). Proc. Zool. Soc. London, 124, 531-534.

JAWOREK, D.; GRUBER, W. y BERGMAYER, H.U. (1974). Adenosine-5'-monophosphate, adenosine-5'-diphosphate y adenosine-5'-triphosphate, En "Methods of enzymatic analysis", 2<sup>a</sup> edn. (Ed. H.U. Bergmeyer), Academic Press, New York, Vol. IV, pp 2127-2131 y 2097-2101.

JENSEN, G.S. (1981). A comparison of some properties of myocardial phosphofructokinase from the rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.) and the diving turtle (*Pseudemys scripta*). Comp. Biochem. Physiol., 70 B, 161-164.

JENSEN, G.S. y GESSER, M. (1980). Properties of phosphofructokinase and tolerance to hipoxia in vertebrate myocardia, Comp. Biochem. Physiol., 66 B, 171-174.

JOHNSTON, I.A. (1975a). Studies on the swimming musculature of the rainbow trout II. Muscle metabolism during severe hipoxia, J. Fish. Biol., 7, 459-467.

JOHNSTON, I.A. (1975b). Pyruvate kinase from the red skeletal musculature of the carp (*Carassius auratus* L.), Biochem. Biophys. Res. Commun., 63, 115-120.

JOHNSTON, I.A. (1981). Structure and function of muscle, Zool. Symp. Vertebrate locomotion, (Ed. M.H. Day), Academic Press, London, Vol 45, pp 71-113.

JOHNSTON, I.A. (1982a). Biochemistry of myosins and contractile properties of fish skeletal muscle, Elsevier Biomedical Press.

JOHNSTON, I.A. (1982b). Physiology of muscle in hatchery raised fish, Comp. Biochem. Physiol., 73 B, 105-124.

JOHNSTON, I.A. y MOON, T.W. (1981). Fine structure and metabolism of multiply innervated fast muscle fibres in teleost fish, Cell, Tiss. Res., 219, 93-109.

JOHNSTON, I.A.; PATTERSON, S.; WARD, P.S. y GOLDSPIK, G. (1974). The histochemical demonstration of myofibrillar adenosine triphosphate activity in fish muscle, Can. J. Zool., 52, 871-877.

JOHNSTON, I.A.; DAVIDSON, W. Y GOLDSPIK, G. (1975). Adaptations in Mg<sup>2+</sup>-activated myofibrillar ATPase activity induced by temperature acclimation, FEBS lett., 50, 293-295.

- JOHNSTON, I.A.; DAVIDSON, W. y GOLDSPIK, G. (1977). Energy metabolism of carp swimming muscle. *J. Comp. Physiol.* 114, 203-216.
- JORGENSEN, J.B. y MUSTAFA, T. (1980). The effect of hypoxia on carbohydrate metabolism in flounder (*Platichthys flesus* L.) II. High energy phosphate compounds and the role of glycolytic and gluconeogenic enzymes. *Comp. Biochem. Physiol.* 67B, 249-256.
- KAYNE, F.J. (1973). Pyruvate kinase. En "The enzymes", 3ª edn. (Ed. P.D. Boyer). Academic Press, New York, Vol. 8, pp 353-382.
- KELLY, G.J. y TURNER, J.F. (1971). Cooperativity in pea-seed phosphofructokinase. *Biochim. Biophys. Acta*, 242, 559-565.
- KEMP, R.G. (1973). Inhibition of muscle pyruvate kinase by creatine phosphate. *J. Biol. Chem.* 10, 3963-3967.
- KEMP, R.G. y FOE, L.G. (1983). Allosteric regulatory properties of muscle phosphofructokinase. *Mol. Cell. Biochem.* 57, 147-154.
- KITAJIMA, S. y UYEDA, K. (1983). *J. Biol. Chem.* 258, 7352-7357.
- KNOX, D.; WALTON, M.J. y COWEY, C.B. (1980). Distribution of enzymes of glycolysis and gluconeogenesis in fish tissues. *Mar Biol.* 56, 7-10.
- KUN, R. y KEARNEY, J.B. (1974). Ammonia. En "Methods of enzymatic analysis", 2ª edn. (Ed. H.U. Bergmeyer). Academic Press, New York, Vol III, pp. 1802-1806.
- LAEMLI, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature*, 227, 680-681.
- LANG, G. y MICHAL, G. (1974). D-glucose-6-phosphate and D-fructose-6-phosphate. En "Methods of enzymatic analysis", 2ª edn. (Ed. H.U. Bergmeyer). Academic Press, New York, Vol III, 1238-1242.
- LARDY, H.A. y PARKS, R.E. Jr. (1956). en "Enzymes. Unit of Biological structure and function". (Ed. D.H. Gaebler). Academic Press, New York, pp 239-278 y 584.
- LASSERE, P. (1971). Increase of the (Na<sup>+</sup> + K<sup>+</sup>), dependant ATPase activity in gills and kidney of two euryhaline teleost, *Crenimugil labrosus* R. y *Dicentrarchus labrax* L. during adaptation to fresh water. *Life Sci.* 10, 113-119.
- LAYZER, R.B. (1975). Phosphofructokinase. En "Methods in enzymology". (Ed. W.A. Wood). Academic Press, New York, Vol 52, 110-114.
- LEAVER, J. y BURT, J.K. (1981). Purification and properties of phosphofructokinase from cod (*Gadus morhua*) muscle. *Comp. Biochem. Physiol.* 69B, 127-132.
- LEE, M.Y.; KRUPKA, R.M. y COOK, R.A. (1973). Cooperativity in human erythrocytes phosphofructokinase. *Eur. J. Biochem.* 26, 442-448.
- LEON, O.; MORAN, A. y GONZALEZ, T. (1982). Purification and characterization of pyruvate kinase from muscle of the sea mollusc *Concholepas concholepas*. *Comp. Biochem. Physiol.* 72B, 65-69.

- LERAY, C. y BACHAND, L. (1975). Erythrocyte metabolism in the yellow perch (*Perca flavescens mitchilli*) II. Intermediates, nucleotides and free energy changes in glycolytic reactions. *Comp. Biochem. Physiol.* 51B, 349-353.
- LIN, M.; TURPIN, D.H. y PLAXTON, W.C. (1989). Pyruvate kinase isozymes from the green alga *Selanosira minutum*. *Arch. Biochem. Biophys.* 269, 219-227.
- LOVEL, R.T. (1979). Fish culture in the United States. *Science*, 206, 1368-1372.
- LOW, P.S. y SOMERO, G.N. (1976). Adaptation of muscle pyruvate kinases to environmental temperatures y pressures. *J. Exp. Zool.* 198, 1-12.
- LOWRY, O.H.; ROSEBROUGH, N.J.; FAR, A.L. y RANDALL, K.J. (1951). Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 264-275.
- LOZANO CABO, F. (1964). Los peces de la aguas continentales españolas. Servicio nacional de pesca fluvial y caza. Madrid, pp 247-250.
- LUTHER, M.A.; GILBERT, H.F. y LEE, J.C. (1983). Self-association of muscle phosphofructokinase: Role of subunit interaction in regulation of enzyme activity. *Biochemistry*, 22, 5494-5500.
- MAC LEOD, R.A.; JONAS, R.E. y ROBERTS, E. (1963). Glycolytic enzymes in the tissue of salmonid fish (*Salmo gairdneri*). *Canad. J. Biochem. Physiol.* 41, 1971-1976.
- MACY, J.M.; LJUNGAHL, L.G. y GOTTCALK, G. (1978). Pathway of succinate and propionate formation in *Bacteroides fragilis*. *J. Bacteriol.* 134, 84-91.
- MARSHALL, T. y WILLIAMS, K.M. (1986). *Biotechniques*, 4, 308-310.
- MASTERS, C.J. (1985). Phosphofructokinase comparison and the regulation of glycolysis. *Trends. Biochem. Sci.* 10, 189.
- MATEOS, A.M. (1990). Factores que inciden en el cultivo integral de la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.). Tesis doctoral. Facultad de Ciencias Biológicas. Universidad Complutense de Madrid.
- MAVIS, R.D. y STELLWÄGEN, E. (1970). The role of cations in yeast phosphofructokinase catalysis. *J. Biol. Chem.* 245, 674-680.
- MEDINA, M.M. (1986). Aislamiento y purificación de la enzima 6-fosfogluconato deshidrogenasa de hígado de lubina (*Dicentrarchus labrax* L.); Estudio de sus propiedades cinéticas y reguladoras. Tesis doctoral. Facultad de Farmacia. Universidad Complutense de Madrid.
- MICHAELIDIS, B. y STOREY, K.B. (1990). Influence of pH on the regulatory properties of aerobic and anoxic forms of pyruvate kinase in a marine whelk. *J. Exp. Zool.* 253, 245-251.
- MICHAELIDIS, B. y STOREY, K.B. (1991). Evidence for phosphorylation/dephosphorylation control of phosphofructokinase from organs of the anoxia tolerant sea mussel *Mytilus edulis*. *J. Exp. Zool.* 257, 1-4.

MICHAL, G. y BEUTLER, H.O. (1974). D-fructose-1,6-diphosphate, Dihydroxyacetone phosphate and D-Glyceraldehyde-3-phosphate. En "Methods of enzymatic analysis", 2ª edn. (Ed. H.U. Bergmeyer), Academic Press, New York, Vol III, pp 2136-2144.

MIYATAKE, K.; SAKAKURABA, H. y KITAOKA, S. (1986). Fructose 2,6 bisphosphate activates pyruvate kinase from the protist *Euglena gracilis*, Agric. Biol. Chem, 50, 2647-2649.

MOON, T.W. y HULBERT, W.C. (1980a). Characteristics of pyruvate kinases isolated from tissues of the american eel (*Angilla rostrata le sueur*). Comp. Biochem. Physiol, 78 B, 283-289.

MOON, T.W. y HULBERT, W.C. (1980b). Regulatory properties of pyruvate kinase isolated from tissues of the american eel (*Angilla rostrata le sueur*). Comp. Biochem. Physiol, 65 B, 291-296.

MOSS, D.W. (1982). En "Isoenzymes", (Ed. Chapman y Hall), New York, pp 130-131.

MUNDAY, K.A.; GILES, I.G. y POAT, P.C. (1980). Review of the comparative biochemistry of pyruvate kinase, Comp. Biochem. Physiol, 67 B, 403-411.

NAGAYAMA, F. y SAITO, Y. (1969). Distribution of several hydrolytic enzymes in fish. EIFAC, Tech. Pap. 2, 103-116.

NGO, J.; CHUTE, H.; SANDERS, D.; ORLANDO, R. y IBSEN, K. (1983). Regulation of pyruvate kinase expresion and growth in mastocytoma cells. I. Initial observations. Experimental Cell Research, 149, 565-575.

NICHOLS, F; NICHOLS, P. y UMEZAWA, K. (1976). Phosphofructokinase and related glycolytic enzymes in fish. Bull. Jap. Soc. Sci. Fish, 39, 1349-1355.

NOGUCHI, T. y TANAKA, T. (1982). The M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> subunits of rat pyruvate kinase are encoded by different messenger RNAs. J. Biol. Chem, 257, 1110-1113.

NOGUCHI, T.; INOUE, H. y TANAKA, T. (1986). The M<sub>1</sub> and M<sub>2</sub> type isozymes of rat pyruvate kinase are produced from the same gene by alternative RNA splicing. J. Biol. Chem, 261, 13807-13812.

OCAMPOS, D.; DEGUIRMENDJIAN, R.; RODRIGUES, E. y RUBENS, R. (1987). Kinetic properties of pyruvate kinase from the epaxial muscle of the marine fishes *Mugil lisa* y *Chaetoditerus faber*. Comp. Biochem. Physiol, 88 B, 625-630.

O'SULLIVAN, W.J. y PERRIN, D.D. (1964). The stability constants of metal-adenosine nucleotide complexes. Biochemistry, 3, 18-26.

OTTO, M.; HEINRICH, R.; DUHN, B. y JACOBASH, G. (1974). A mathematical model for the influence of F6P, ATP, potassium, ammonium and magnesium on the phosphofructokinase from rat erythrocytes. Eur. J. Biochem, 42, 169-178.

PAETKOV, V. y LARDY, H.A. (1967). Phosphofructokinase. Correlation of physical and enzymatic properties. J. Biol. Chem, 242, 2035-2042.

PALMER, T.N. y RYAN, B.E. (1972). Studies on oral glucose intolerance in fish. J. Fish. Biol, 4, 311-319.

PARKHOUSE, W.S. (1986). Metabolic regulation of skeletal muscle energy metabolism during exercise. Tesis doctoral, University of British Columbia, pp 177.

PATTERSON, S. y GOLDSPIK, K.G. (1972). The fine structure of red and white myotomal muscle in marine teleost, the coalfish, *Z. Zellforsch. Mikrosk. Anat.* 133, 463-474.

PATTERSON, S. y GOLDSPIK, K.G. (1976). Mechanism of myofibril growth and proliferation in fish muscle, *J. Cell. Sci.* 22, 607-616.

PERRY, S.V. (1977). The regulation of contractile activity in muscle, The twelfth CIBA Medal lecture, Meeting of the Biochemical Society, pp 592-607.

PETTERSON, J.S.; CHERN, C.J.; HAWKINS, R.N. y BLACK, J.A. (1974). *FEBS Let.* 39, 73-77.

PETTIGREW, D.W. y FRIEDEN, C. (1979a). Binding of regulatory ligands to rabbit muscle phosphofructokinase. A model for nucleotide binding as a function of temperature and pH. *J. Biol. Chem.* 254, 1887-1895.

PETTIGREW, D.W. y FRIEDEN, C. (1979b). Rabbit muscle phosphofructokinase. A model for regulatory kinetic behaviour. *J. Biol. Chem.* 254, 1896-1901.

PHELAN, T.J. y GRAY, H. (1984). Modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase EC, 1.2.1.12, isolated from rainbow trout during acclimation at 5 or 15°C. I. Changes in the activity of individual muscle isolates as evidence for variable adaptative responses, *Comp. Biochem. Physiol.* 79B, 135-138.

PLAXTON, C. y STOREY, K.B. (1984). Purification and properties of aerobic and anoxic forms of pyruvate kinase from red muscle tissue of channeled whelk, *Busycotopus canaliculatus*, *Eur. J. Biochem.* 143, 257-265.

POGSON, C.I. y RANDALL, P.J. (1966). The control of rat heart phosphofructokinase by citrate and other regulators, *Biochem. J.* 100, 683-693.

RACKER, G. (1984). The rate limiting steps in glycolysis, *Trends. Biochem. Sci.* 9, 516.

RANDALL, R.F. y ANDERSON, P.J. (1975). Purification and properties of the pyruvate kinase of sturgeon muscle, *Biochem. J.* 145, 569-573.

RANDALL, P.J. y DAXBOECK, C. (1982). Cardiovascular changes in the rainbow trout (*Salmo gairdneri*) during exercise, *Can. J. Zool.* 60, 1135-1142.

RAMOS, J.; CARRILLO, M.; ZANUY, S. y KOBAYAKI, K. (1982). Crecimiento y aprovechamiento del alimento de la lubina (*Dicentrarchus labrax* L.), *Inf. Tecn. Inst. Inv. Pesq.* 24, 3-12.

REEVES, R.E.; SOUTH, D.J.; BLYT, H.J. y WARREN, L.G. (1974). Pyrophosphate: D-fructose-6 phosphate 1 phosphotransferase a new enzyme with the glycolytic fraction of 6 phosphofructokinase, *J. Biol. Chem.* 249, 7737-7741.

REINHART, G.D. (1983). Influence of fructose 2,6 bisphosphate on the aggregation properties of rat liver phosphofructokinase, *J. Biol. Chem.* 258, 10827-10830.

- REINHART, S.D. y LARDY, H.A. (1980). Rat liver phosphofructokinase: kinetic activity under near physiological conditions, *Biochemistry*, 19, 1477-1484.
- ROBERTS, B. y ANDERSON, P.J. (1985). The purification and kinetic characterization of eel white muscle pyruvate kinase, *Comp. Biochem. Physiol.* 80 B, 51-56.
- SABATER, B. Y DE LA FUENTE, G. (1975). Kinetic properties and related changes of molecular weight in a fructokinase from *Streptomyces violaceoruber*, *Biochim. Biophys. Acta*, 377, 258-270.
- SAND, O. (1981a). Purification and properties of phosphofructokinase from liver of the flounder (*Platichthys flesus* L.), *Comp. Biochem. Physiol.* 68 B, 77-81.
- SAND, O. (1981b). Kinetic properties of phosphofructokinase from the flounder (*Platichthys flesus* L.), *Comp. Biochem. Physiol.* 69 B, 435-443.
- SAND, O. (1984). Purification and properties of pyruvate kinase from liver of the flounder (*Platichthys flesus* L.), *Comp. Biochem. Physiol.* 79 B, 473-479.
- SAND, O. (1986). Kinetic properties of liver pyruvate kinase from the flounder (*Platichthys flesus* L.), *Comp. Biochem. Physiol.* 79 B, 91-96.
- SAND, O. (1988). The effect of fructose 1,6 diphosphate on pyruvate kinase from the liver of the flounder (*Platichthys flesus* L.), *Comp. Biochem. Physiol.* 90 B, 401-407.
- SEIBERT, H. (1985). Effects of temperature on glucose release and glycogen metabolism in isolated hepatocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*), *Comp. Biochem. Physiol.* 81 B, 877-883.
- SEUBERT, W. y SCHÖNER, W. (1971). Pyruvate kinase. En "Current topics in cellular regulation", (Ed. B.L. Horecker y E.R. Stadman), Academic Press, New York, Vol. 3, pp 237.
- SHIBATA, T. (1977). Enzymological studies on the glycolytic system in the muscles of aquatic animals. Tesis doctoral, Hokkaido University, pp 1-80.
- SMITH, R.R. (1971). A method of measuring digestibility and metabolizable energy of fish feed, *Prog. Fish. Cult.* 33, 132-134.
- SOLS, A.; CASTARO, S.G.; ARAGON, J.J.; DOMENECH, C.; LAZO, P.A. y NIETO, A. (1981). En "Metabolic interconversion of enzymes", (Ed. H. Holzer), Springer Verlag, Berlin, New York, pp 111-123.
- SOMERO, G.N. (1969). Pyruvate kinase variants of the Alaskan king crab, *Biochem. J.* 114, 237.
- SOMERO, G.N. y HOCHACHKA, P.W. (1968). The effect of temperature on catalytic and regulatory functions of pyruvate kinase of the rainbow trout and the antarctic fish *Trematomus bernacchii*, *Biochem. J.* 110, 395-400.
- SOMERO, G.N.; GIESE, A.C. y WOHLSCHLAG, D.E. (1968). Cold adaptation of the antarctic fish *Trematomus bernacchii*, *Comp. Biochem. Physiol.* 26, 223-231.

SPERANZA, M.L.; VALENTINI, G. y MALCOVATI, M. (1990). Fructose 1,6 Bisphosphate activated pyruvate kinase from *Escherichia coli*. Nature of bonds involved in the allosteric mechanism. Eur. J. Biochem. 191, 701-704.

TAKENAKA, M.; NOGUCHI, T.; INOUE, H.; YAMADA, K.; MATSUDA, T. y TANAKA, T. (1989). Rat pyruvate kinase M gene. Its complete structure and characterization of the 5'-flanking region. J. Biol. Chem. 264, 2363-2367.

TANAKA, T.; IMAMURA, K.; ANN, T. y TANIUCHI, K. (1972). Multimolecular forms of pyruvate kinase and phosphofructokinase in normal and cancer tissues. GANN, Monograph on Cancer Research, 13, 219-234.

TASAI, M.Y.; GONZALEZ, F. y KEMP, R.G. (1975). En "Isozymes". (Ed, C.L. Market). Academic Press, New York, Vol. 2, pp 818-835.

TEIPEL, I. y KOSHLAND, D.E. (1969). The significance of intermediary plateau-regions in enzyme saturation curves. Biochemistry. N.Y. 8, 4656-4663.

THORPE, A. e INCE, B.W. (1976). Plasma insulin levels in teleost determined by a charcoal separation radio immuno assay technique. Gen. Comp. Endocr. 30, 332-339.

TORNHEIN, K. (1976). Oscillations of the glycolytic pathway and the purine nucleotide cycle. J. Theor. Biol. 79, 491-541.

TORNHEIN, K. (1985). Activation of muscle phosphofructokinase by fructose 2,6 bisphosphate and fructose 1,6 bisphosphate is differently affected by other regulatory metabolites. J. Biol. Chem. 260, 7985-7989.

TORRES, M.V.; SANCHEZ, L.D.; PEREZ, J.A. y MELENDEZ-HEVIA, E. (1984). Regulation of glycolysis in lizards: Kinetic studies on liver pyruvate kinase and phosphofructokinase from *Lacerta galloti*. Comp. Biochem. Physiol. 77 B, 289-294.

TSAI, H.I. y KEMP, R.G. (1974). Isozymes of rabbit phosphofructokinase. J. Biol. Chem. 248, 785-792.

TURNER, J.F. y TURNER, D.H. (1980). En "The Biochemistry of Plants". (Ed, D.D. Davies). Academic Press, New York, pp 279-316.

USHIYAMA, H.; FUJIMARA, T.; SHIBATA, T. y YOSHIMARA, K. (1965). Carbohydrates in the pyloric caeca of salmon. Hosoide Daigaku Suidan Yakubu Kenyu. Iho. 16, 183-188.

UYEDA, K. (1979). Phosphofructokinase. En "Advances in Enzymology". (Ed. A. Meister). J. Wiley, New York, Vol. 48, pp 193-244.

VAN BERKEL, J.C. y KOSTER, J.F. (1973). M type pyruvate kinase of leucocytes: an allosteric enzyme. Biochim. Biophys. Acta. 203, 134-139.

VAN PILSUN, J.F. (1988). Metabolismo del musculo esquelatico. En "Bioquimica". (Ed. T.M. Davlin). Reverte, Barcelona, pp 1022-1033.

VAN SCHAFTINGEN, E. y HERS, H.G. (1983). The role of fructose 2,6 bisphosphate in the long term control of phosphofructokinase in rat liver. Biochem. Biophys. Res. Commun. 113, 548-554.



- VAN SCHAFTINGEN, E.; CEDERER, B.; BARTRONS, R. y HERS, H.G. (1982). A kinetic study of pyrophosphate:fructose 6 phosphotransferase from potato tubers. *Eur. J. Biochem.* 129, 191-195.
- VAN SCHAFTINGEN, E.; OPPERDOES, R. y HERS, H.G. (1985). Stimulation of *Trypanosoma brucei* pyruvate kinase by fructose 2,6 bisphosphate. *Eur. J. Biochem.* 153, 403-406.
- VORA, S. (1982). Isozymes of phosphofructokinase. *Isozymes, Curr. Top. Biol. Med. Res.* 6, 119-167.
- VORA, S. (1983). Isozymes of phosphofructokinase. Biochemical and genetic aspects. *Isoenzymes, Curr. Top. Biol. Med. Res.* 11, 3-23.
- VORA, S.; OSKAN, R. y STAAL, G.E. (1985a). Isozymes of phosphofructokinase in the rat. Demonstration of the three nonidentical subunits by chemical immunochemical and kinetic studies. *Biochem. J.* 219, 333-341.
- VORA, S.; HALPER, J.P. y KNOWLER, D.H. (1985b). Alterations in the activity and isoenzyme profile of human phosphofructokinase during malignant transformation "in vivo" and "in vitro". Transformation and progression linked discriminants of malignancy. *Cancer, Res.* 45, 2953-3001.
- WALTON, M.J. y COWEY, C.B. (1982). Aspect on intermediary metabolism in salmonid fish. *Comp. Biochem. Physiol.* 73 B, 59-79.
- WARBURG, O. y CRISTIAN, W. (1941). Protein stimulation by extraction at 260 and 280 nm. *Biochem. Z.* 310, 384-392.
- WIESER, W. (1977). Slow, fast and medium fast responses of ectotherms temperature changes. A new mechanism of metabolic compensation in *Helix pomatia*. *J. Thera. Biol.* 2, 197-202.
- WIESER, W. y LACKNER, R. (1977). Inhibition of the pyruvate kinase of *Helix pomatia* L. by phospho-2-arginine. *FEBS lett.* 80, 299-302.
- WOKOMA, A. y JOHNSTON, I.A. (1981). Lactate production at high sustainable cruising speedes in rainbow trout (*Salmo gairdneri* R.). *J. Exp. Biol.* 90, 316-364.
- WU, S.W.N.; WONG, S.C. y YEUNG, D. (1977). Comparative studies of vertebrate and invertebrate pyruvate kinases. *Comp. Biochem. Physiol.* 61 B, 93-98.
- YAMAMAKI, H. (1983). Lactate dehydrogenase activity, and lactate pyruvate ratio in muscle of thermally acclimated goldfish. *Comp. Biochem. Physiol.* 62 B, 89-93.
- ZAMMIT, V.S.; BEIS, I. y NEWSHOLME, E.A. (1978). Maximum activities and effects of fructose bisphosphate on pyruvate kinase from muscles of vertebrates and invertebrates in relation to the control of glycolysis. *Biochem. J.* 174, 989-998.
- ZAMORA, S. y ECHEVARRIA, G. (1987). Los hidratos de carbono en la nutrición de los peces. En "Nutrición en acuicultura II". (ed. J. Espinosa de los Monteros y V. Laverata). CAYCIT, pp 167-197.